

Abschlussbericht¹

gemäß den Nebenbestimmungen NKBF 98, ANBest-P und BNBest 98 des
Bundesministeriums für Bildung und Forschung

Verbundprojekt:

Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings SteriTEL

Förderkennzeichen:

02WU0787, 0788, 0789, 0790, 0791, 0792

-4H- JENA engineering GmbH (4HJE) / Projektkoordinator



IOM Innovative Optische Messtechnik GmbH (IOM)



Sensortechnik Meinsberg GmbH (STM)



Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. (iba)



Martin-Luther-Universität Halle, Institut f. Physiolog. Chemie (MLU)



CAM-D Technologies GmbH (CAM-D)



Laufzeit des Vorhabens:

01.08.2006 - 31.10.2009

¹ Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter den Förderkennzeichen 02WU0787 bis 02WU0792 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Inhaltsverzeichnis

1	Aufgabenstellung	3
2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	3
3	Planung und Ablauf des Vorhabens	5
4	Wissenschaftlich-technischer Stand, an den angeknüpft wurde	6
5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	9
6	Erzielte Ergebnisse	11
6.1	Synthese der Tetraetherlipidschicht	12
6.1.1	Gewinnung des Lipids	12
6.1.2	Lipidierungsmethodik	14
6.1.3	Entwicklung sterisch barrierebildender Schichten	18
6.1.4	Darstellung von Tetraetherlipidschichten	21
6.2	Modellierung	24
6.2.1	Molekulare Analyse der Lipidschichten mittels MM/MD-Simulation	24
6.2.2	Modellierung und Optimierung des Lipidierungsprozesses durch MFD-Simulation ...	26
6.3	Schichtcharakterisierung	28
6.3.1	Grenz- und Oberflächenanalytik	28
6.3.2	Physikochemische Charakterisierung	35
6.3.3	Topografische Charakterisierung	37
6.3.4	Charakterisierung der Sensorfunktionalität	39
6.4	Bioadhäsionsprüfung	49
6.4.1	Applikationsmodelle im Labor	50
6.4.2	Feldtests	58
6.5	Biofilmsimulation	65
6.5.1	Prognosemodell	65
6.5.2	Biofilmsimulation-Software	67
6.5.3	Validierung des Modells	68
6.6	Technologische Umsetzung	70
6.6.1	Scale-up des Beschichtungsprozesses	70
6.6.2	Sensorfunktionsmuster	71
6.6.3	Anpassung der Beschichtung an die Sensorfunktionsmuster	81
6.6.4	Entwicklung eines Wartungs- und Kontrollsystems	82
7	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	86
8	Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt bei anderen Stellen	89
9	Realisierte und geplante Veröffentlichungen	93
10	Danksagung	95

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

1 Aufgabenstellung

Beim Verbleib in wässrigen Medien werden Sensorsysteme binnen kurzer Zeit mit einer Bewuchsschicht aus verschiedensten Organismen und anorganischen/ organischen Stoffkomponenten (Biofilm) bedeckt - ein bisher kaum vermeidbares Phänomen, welches die Funktionsfähigkeit und Zuverlässigkeit des Sensors in Frage stellt. Das Ziel des Verbundvorhabens bestand darin, ein effektives Antifoulingkonzept für das Gewässermonitoring auf der Basis von sterisch funktionalisierten Tetraetherlipiden zu entwickeln und praxisorientiert umzusetzen.

Dementsprechend bestand die *wissenschaftlichen Zielstellung* des Projektes darin, eine Synthese applikationsspezifischer Tetraetherlipid-Schichten zu entwickeln, die eine sterische Entkopplung der sensorischen Funktionsflächen vom foulingaktiven Medium erlauben. Des Weiteren zielte die wissenschaftliche Arbeit auf die Entwicklung und Implementierung eines kolloidchemischen Modells für die Interpretation und Prognose der initialen bakteriellen Adhäsion auf Substratoberflächen.

Die *technische Zielstellung* bestand dabei in der Etablierung einer kommerziell einsetzbaren, effizienten und reproduzierbaren Beschichtungstechnologie auf der Basis von Self-Assembling-Prozessen der Tetraetherlipide. Die technologische Umsetzung wird ergänzt durch eine Funktionalisierungsschemie basierend auf der Selektion barrierebildender funktioneller Gruppen für die sterische Entkopplung der Sensoroberflächen.

2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Im Fokus der Untersuchungen standen die Entwicklung, Validierung und technologische Umsetzung langzeitstabiler Antifoulingkonzepte für das Gewässermonitoring und die Abwasseranalytik.

Die Lösung der wissenschaftlichen Problemstellung basiert auf der Nutzung von archaealen Tetraetherlipiden. Diese Moleküle bilden eine ideale chemische Plattform basierend auf einem kovalent fixierten Spacermolekül mit evolutiv optimierten Eigenschaften und einem hohen Maß an selektiver Modifizierbarkeit. Im Rahmen der zuvor durchgeführten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass monomolekulare Tetraetherlipid-Schichten für eine kompakte homogene Bedeckung unterschiedlich strukturierter Substratoberflächen eingesetzt werden können. Es sind Lipidschichten mit spezifischen Oberflächenparametern technisch realisierbar. Des Weiteren wurde die Modifizierung der Coatings die Kopplung von Funktionsmolekülen erfolgreich demonstriert. Unterschiedlichste Tests im Labor und im Feldversuch zeigten eine deutlich reduzierte Biofilmbildung durch verschieden modifizierte Lipidschichten.

Die Optimierung Tetraetherlipid-basierter Antifoulingkonzepte ist durch verbesserte Eigenschaften und spezifische flexible Anwendungsmöglichkeiten gekennzeichnet. Angestrebt wurde die technische Realisierung eines universellen Beschichtungsprozesses für Sensoren, der eine definierte sensorische Funktionalität möglich macht und gleichzeitig die mikrobiologisch induzierte Foulingaktivität wirksam unterdrückt. Ein praxisnahes Prognosemodell zur Biofilmsimulation bildet das wissenschaftlich fundierte Optimierungstool.

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Diese Zielstellung sollte im Wesentlichen in drei Etappen erreicht werden.

1. Synthese applikationsspezifischer Tetraetherlipid-Schichten, die eine sterische Entkopplung der sensorischen Funktionsflächen vom foulingaktiven Medium erlauben,
2. Entwicklung und Implementierung eines kolloidchemischen Modells für die Interpretation und Prognose der initialen bakteriellen Adhäsion auf Substratoberflächen,
3. Realisierung des technischen Scale-ups der Beschichtungstechnologie und Nachweis der Beschichtungsqualität im Labor und Feld einschließlich einer Markteinführung.

Im Vorhaben war für die Optimierung Tetraetherlipid-basierter Antifoulingkonzepte für sensorische Funktionsflächen folgende Strategie vorgesehen:

- technologische Umsetzung bereits validierter Tetraetherlipid-basierter Konzepte im industriellen Maßstab,
- Optimierung der unspezifisch, d.h. physikochemisch wirkenden Antifouling-Beschichtungen durch gezielte Einflussnahme auf die sterischen Wechselwirkungen an der Grenzfläche und
- Kopplung funktionalisierter Tetraetherlipidschichten mit kommerziellen Reinigungssystemen und konstruktiven Optimierungen.

IOM

Die IOM Innovative Optische Meßtechnik GmbH hat als Zuwendungsempfänger im Teilprojekt 2 des Verbundvorhabens am 27. März 2007 einen Insolvenzantrag gestellt. Mit der Eröffnung des Insolvenzverfahrens am 16. April 2007 ist der Geschäftsbetrieb der insolventen IOM GmbH einschließlich der Namensrechte vom Insolvenzverwalter verkauft worden. Mit Wirkung vom 17. April 2007 hat der Käufer seinen Sitz nach Berlin verlegt und sich in „IOM Innovative Optische Messtechnik GmbH“ (Messtechnik mit Doppel-s) umbenannt.

Die IOM (neu) hat mit der vollständigen Übernahme des Geschäftsbetriebs auch alle das Forschungsprojekt betreffenden Materialien, Ergebnisse und Unterlagen und alle Rechte und Pflichten vollständig übernommen.

Das Forschungsvorhaben konnte dadurch ohne Verzögerung weitergeführt und in allen Punkten erfolgreich abgeschlossen werden.

CAM-D

Das Vorhaben wurde im Wesentlichen durch 2 Mitarbeiter der CAM-D Technologies GmbH eigenverantwortlich bearbeitet. Unterstützung bekamen die Mitarbeiter von zusätzlichem Personal, das zeitweise für das Projekt eingeteilt wurde. Die Computersimulationen wurden mit der bei CAM-D vorhandenen Infrastruktur (Parallelrechner, Workstation) sowie mit den bei CAM-D entwickelten Methoden und Verfahren durchgeführt.

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Durchführung des Vorhabens erfolgte arbeitsteilig auf der Grundlage von zwischen den beteiligten Einrichtungen abgestimmten Arbeitsplänen jedes Projektpartners. Die Koordination und administrative Verwaltung des Verbundvorhabens oblag einem Industriepartner, der -4H- JENA engineering GmbH. Folgende Teilprojekte wurden bearbeitet:

- 4H- JENA engineering GmbH [4HJE]
 Applikation von Antifoulingkonzepten auf der Basis sterischer Entkopplung in Durchflusssmesssystemen und Nährstoffanalysatoren für die Gewässerüberwachung
- IOM GmbH [IOM]
 Antifouling-beschichtete, höchstempfindliche faseroptische Fluoreszenzsonden für die Wasseranalytik
- Sensortechnik Meinsberg GmbH [STM]
 Charakterisierung und Test optimierter Tetraetherlipidschichten als foulingresistente Überzüge auf elektrochemischen Sensoren für die Wasseranalytik
- Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. [iba]
 Herstellung und Testung sterisch optimierter TEL-Coatings unter Anwendung eines neuartigen Prognosemodells zur Simulation der initialen bakteriellen Adhäsion
- Martin Luther Universität Halle, Institut für Physiologische Chemie [MLU]
 Applikationsspezifische Antifoulingausrüstung von Sensoroberflächen durch Aufbringen einer Tetraetherlipid-Beschichtung mit sterisch entkoppelnder Wirkung
- CAM-D Technologies GmbH Essen [CAMD]
 Untersuchung und Optimierung der Wechselwirkung zwischen Tetraetherlipiden und Festkörperoberflächen mit mesoskopischen Computersimulationen

IOM

Untersuchungen zur Biofilmdetektion auf festen Oberflächen und zum Gewässermonitoring durch Messung der uv-induzierten Autofluoreszenz, Zuarbeit zur Entwicklung eines feldtauglichen Qualitätskontrollsystems für die Antifouling-Beschichtung.

CAM-D

Experimentelle Laboruntersuchungen wurden bei unserem Projektpartner, dem iba in Heiligenstadt durchgeführt. Da das iba federführend im Verbundprojekt tätig war, waren die Ergebnisse der Laboruntersuchungen von zentraler Bedeutung. Der im Projektantrag formulierte Arbeitsplan war Basis der langfristigen Orientierung der Untersuchungen. Die Computersimulationen basierten auf den Ergebnissen und Auswertungen der Laborexperimente am iba. Es fand ein intensiver Austausch mit dem iba und auch mit der MLU in Halle statt, die Synthesen und analytische Untersuchungen der Tetraetherlipide durchführten. Um flexibel auf die experimentellen Ergebnisse zu reagieren und um die Simulationen mit den Experimenten zu synchronisieren, wurden die theoretischen Berechnungen weitgehend mit den Projektpartnern iba und MLU abgesprochen.

4 Wissenschaftlich-technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Stand der Wissenschaft und Technik

Die Abwehr bzw. Verhinderung des möglichen Bewuchses (Bakterien, Pilze, Pflanzen, Tiere), welcher besonders in Gewässern mit hoher biologischer Aktivität auftritt, ist für eine über längere Zeiträume wartungsfreie Funktion (Langzeitstabilität) von großer Bedeutung. Der Stand der Technik bezüglich Antifoulingmaßnahmen für elektrochemische und optische Sensoren und Sonden für *in situ*-Anwendungen in der Gewässermesstechnik ist nach wie vor unzureichend. Durch Bewuchs aus verschiedenen Organismen kommt es nach kurzer Zeit zur Bedeckung des gesamten Sensors, wodurch seine Funktionsfähigkeit in Frage gestellt bzw. nicht mehr gewährleistet werden kann. Für Antifoulingmaßnahmen in Verbindung mit chemischen Sensoren sind mechanische Reinigungsverfahren, wie Einsatz von Bürsten, Reinigung durch Anströmung und automatische Reinigungsverfahren durch Besprühen der Sensoren mit Wasserstrahl, Druckluft oder aggressiven Reinigungslösungen, Stand der Technik. Mechanische Verfahren sind extrem wartungsintensiv, störanfällig und energieaufwendig. Insbesondere bei elektrochemischen Sensoren führen diese außerdem zu einem erhöhten Verschleiß. In der Gewässerüberwachung und Abwasseraufbereitung werden weiterhin Verfahren eingesetzt, die die Strömung des Messmediums in Verbindung mit einer optimalen Konstruktion der Sensoren zur Selbstreinigung nutzen bzw. eine zeitgesteuerte Spülung der Sensoren mit dem Messmedium verwenden. Solche Verfahren sind für die Lebensdauer der Sensoren vorteilhafter, jedoch meist von geringerer Effektivität. Die Reinigung der sensitiven Oberflächen durch Wasserstrahl oder Druckluft erfordert erhebliche zusätzliche Installationen und ist in der Regel wenig effektiv. Als Reinigungslösungen kommen tensidhaltige (alkalische) Mittel oder mit Wasser mischbare, organische Lösungsmittel bzw. Gemische von verdünnter Salzsäure und Thioharnstoff bzw. Pepsin zum Einsatz. Diese Verfahren erfordern eine zusätzliche Steuerung, Pumpen, Vorratsbehälter und sind außerdem kaum mit der zunehmenden Miniaturisierung der Sensoren vereinbar. Unverkennbar ist in letzter Zeit das Bemühen der Hersteller von Analysenmesstechnik zur Verlängerung der Wartungszyklen, zur Reduzierung des Wartungsaufwandes und zur direkten Gewinnung von Informationen über den Sensorzustand (Sensordiagnose). Zahlreiche Hersteller orientieren sich hier an der Verbesserung konventioneller Reinigungsverfahren, der Definition von Wartungsanforderungen durch quasi online Auswertung von Sensorparametern bzw. der redundanten Doppelmessung und Differenzauswertung. Antifoulingmaßnahmen durch Beschichtung der Sensoren sind bisher nahezu unbekannt, da von einer unzulässig hohen Beeinflussung der Sensorkenndaten ausgegangen wird.

Nach wie vor stellt die gezielte Modifikation physikochemischer Materialparameter das aus heutiger Sicht vielversprechendste Antifoulingkonzept dar. Maßgeblich für die Biofilmbildung sind Wechselwirkungen an der Grenzfläche Substrat/Biosystem. Es wird die Wirkung spezifischer und unspezifischer Adhäsionsmechanismen auf der Basis thermodynamischer und kolloidchemischer Systemgrößen diskutiert. Innovative biomimetische Antifoulingkonzepte zielen auf die Maximierung sterischer langreichender Abstoßungskräfte zwischen Bakterium und Oberfläche sowie die Abschirmung der Oberfläche durch gebundenes Wasser mit dem Ziel der Reduzierung spezifischer Bindungen zwischen Makromolekülen. Im Vordergrund steht dabei u.a. die Modifikation von Oberflächen mit Hydrogelen, z.B. PEG, deren wasseradsorbierende Eigenschaften die Stimulation der Wechselwirkung biologischer Systeme mit der Oberfläche reduziert. Daneben führte auch die Applikation oberflächenaktiver Substanzen wie z.B. Phosphorylcholin als Biomembrananaloge durch die Hydratation der zwitterionischen Kopfgruppen zu einer reduzierten Bioadhäsion.

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Es kann geschlussfolgert werden, dass sterische Barrieren auf der Basis geordneter Wasserstrukturen ein aussichtsreiches Konzept verkörpern, um eine effektive Entkopplung der Oberflächen vom umgebenden System zu bewirken. Hier bieten bipolare Tetraetherlipide basierend auf einem Spacermolekül mit optimalen funktionalen Eigenschaften und einen hohen Maß an selektiver Modifizierbarkeit eine ideale chemische Plattform. Es werden Tetraetherlipide (Membranlipide der Archaea) als Basis einer geeigneten Oberflächenmodifizierung zur Gestaltung eines biomimetischen Antifoulingkonzeptes genutzt. Vergleichbare Biomembrananaloga, die derzeit als Antifouling-Beschichtung getestet werden, sind über den inneren Lipidmonolayer direkt an der Materialoberfläche verankert. Die darauf aufbauenden Bilayer sind dementsprechend von relativ geringer Stabilität, so dass der Einsatz auf technischen Funktionsflächen nur bedingt möglich ist. Als Alternative bieten sich auch hierzu die archaealen Tetraetherlipide an, die sich durch gezielte Aktivierung an verschiedenste Materialoberflächen kovalent fixieren lassen. Schon früh wurde als besonderes Merkmal der thermophilen Archaea das Fehlen der Zellwand sowie die charakteristische Struktur der Zellmembran und ihrer Lipide beschrieben, die z.B. die Anpassung an Wachstumstemperaturen von bis zu 90°C und an einen pH-Bereich von 0,5 bis 4 ermöglichen. Zur Unterstützung der Stabilität der Membran gegenüber hohen Temperaturen werden in die Lipide der Zellmembran zusätzlich mehrere Pentazyklen integriert. Die kovalente Fixierung auf verschiedensten Substratoberflächen erfolgt über die Self-Assembling Technik in Chloroformlösung bei ca. 60°C. Eine abschließende gezielte Oberflächenmodifizierung der erreichten Lipidfilme basiert auf der Funktionalisierung der äußeren Kopfgruppen des Tetraetherlipidmoleküls in einem oder mehreren Reaktionsschritten.

Bisherige Arbeiten

Die Forschergruppe aus dem physiologisch-chemischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle, arbeitet seit mehr als 10 Jahren auf einem Grenzgebiet zwischen Biochemie, biophysikalischer Chemie und Materialwissenschaften. Forschungsschwerpunkte sind die Entwicklung neuer Messverfahren im Sinne der Biosensorik sowie Untersuchungen im Bereich der biologischen Barriere "Lipid-Membran".

Das Forschungsprofil des iba Heiligenstadt ist so ausgerichtet, dass vornehmlich Fragestellungen aus dem Bereich der Biotechnologie, Medizintechnik und Umwelttechnik bearbeitet werden, die sich zwischen der Grundlagenforschung und einer mehr marktorientierten Produktforschung ansiedeln lassen. Zu den vorrangigen Aufgaben des FB Biowerkstoffe gehört es, sich mit den Wechselwirkungen zwischen biologischen Systemen und den Oberflächen von technischen und natürlichen Biomaterialien auseinanderzusetzen und diese auf messbare Kenngrößen des Werkstoffs sowie des Biosystems zurückzuführen. Zur Bearbeitung dieser komplexen Problematik hinsichtlich der Bestimmung der Biokompatibilität bzw. Biofunktionalität von biomedizinischen und biotechnologischen Materialien haben sich insbesondere thematische Schwerpunkte wie die Bioadhäsion, das Biofouling und die Biokorrosion/Biodegradation herauskristallisiert.

Gemeinsam mit der Arbeitsgruppe der MLU Halle-Wittenberg wurde im Rahmen eines nationalen Forschungsprojektes (BMBF; Förderkennzeichen 02WU0491-5) eine neuartige Lipidtechnologie entwickelt. Das zentrale Anliegen bestand in dem Aufbau eines biomimetischen Oberflächencoatings auf der Basis archaealer Tetraetherlipide. In diesen vorangegangenen Arbeiten wurde ein archaeales Tetraetherlipid des *Thermoplasma acidophilum* eingesetzt, das zum einen die Generierung dichter, monomolekularer Lipidfilme erlaubt und zum anderen als Spacer für die Anbindung von Funktionsmolekülen dient. Parallel erfolgte die Entwicklung einer neuartigen, schnellen, reproduzierbaren und „trockenen“ Oberflächenaktivierungsprozedur, um ausreichend reaktive OH-Gruppen auf oxidischen Materialien generieren können, die sowohl mit cyanur- als auch mit mesylataktiviertem Tetraetherlipidderivaten (Caldarchaeol) direkt koppeln.

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Entsprechend der definierten Modifikationslevel folgte die Nachfolgederivatisierung der Lipidschichten am Referenzglas Borosilikat. Durch fluoreszenzmikroskopische Analyse und atomkraftmikroskopische Analysen konnte nachgewiesen werden, dass das Self-Assembling zu einer kompakten und homogenen Beschichtung führte. Die nachträgliche Lipidmodifizierung beeinflusste die erreichte Oberflächenhomogenität nicht.

Die mögliche Variation physikochemischer Oberflächeneigenschaften über die Modifikation der zweiten Kopfgruppe des Tetraetherlipids konnte nachgewiesen werden. Es liegen antifoulingrelevante physikochemische Modifizierungen in Form von monomolekularen Beschichtungen vor. Analoge Oberflächencoatings wurden auf Edelstahl- und Silikonoberflächen erzeugt.

Das iba Heiligenstadt verfügt über umfangreiche Erfahrungen im Umgang mit *in vitro*-Testsystemen für Biomaterialien unter Berücksichtigung des applikationsspezifischen biologischen Milieus. Es wurde ein Bioadhäsionsmessplatz etabliert, der zusätzlich eine strömungsmechanische Bewertung hinsichtlich der eingesetzten Fließbedingungen ermöglicht. Eine Kooperation mit der Universität Duisburg/ Essen diente der Erarbeitung von Fermentationsmodellen, die eine möglichst reale Simulation der wässrigen Umgebungsbedingungen im Labormaßstab sicherstellen.

Diese Verringerung der Biofilmbildung konnte in Heiligenstadt im *in vitro*-Labortest sowie durch die Fa. -4H- JENA engineering GmbH in Rahmen eines Feldtests über sieben Wochen in der Talsperre Neustadt eindeutig bestätigt werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden zudem erstmals kolloidchemische Wechselwirkungen in Form von mathematischen Modellansätzen zur Beschreibung der bakteriellen Adhäsion angewendet, um Vorhersagen zur Biofilmbildungskinetik anhand einer numerischen Simulation zu geben.

Seitens der in das Vorhaben eingebundenen Industriepartner konnte auf folgende Erfahrungen zurückgegriffen werden:

Für Aufgaben im Bereich des Gewässermonitorings wurde durch die -4H- JENA engineering GmbH eine automatische Messeinrichtung entwickelt. Das 4HAquaLabor ist ein autonomes, wartungsarmes Messsystem, das speziell für den dauerhaften Einsatz auf Schiffen, Messplattformen und an Flussmessstellen geeignet ist. Die Gerätearchitektur erlaubt den Einsatz einer Vielzahl kundenspezifischer Sensoren, verschiedener Analyseautomaten und/oder Probenehmer.

Für das Vorhaben relevante Projekte unter Beteiligung der -4H- JENA engineering GmbH sind:

- Standzeiterhöhung von Mikrosensoren in biogenen Medien; gefördert durch das TMWTA
- Biocompatible Optical Sensor Systems - BOSS; gefördert durch die EU (BRITE EuRam III)

Sensortechnik Meinsberg ist Entwickler und Hersteller von elektrochemischen Sensoren und Analysen-Messsystemen zur Erfassung der Wasserqualität. Das Unternehmen verfügt über mehr als 50 Jahre Erfahrungen auf diesem Gebiet, Entwicklungskapazität in der Sensortechnik, Fertigungsmöglichkeiten im Bereich der Glasverarbeitung, Mikrosystemtechnik, Elektronik, Gieß- und Klebetechnik sowie über langjährige Erfahrungen in der Anwendung von Analysen-Messtechnik in der Wasser- und Abwasseraufbereitung. Sensortechnik Meinsberg entwickelt und fertigt ein breites Programm an pH- und Redox-Elektroden, Leitfähigkeits-Messzellen, Sauerstoffsensoren, CO₂-Sensoren und Chlor-Messzellen für den Einsatz in Labor und Industrie.

Für das Vorhaben relevante Projekte unter Beteiligung der Sensortechnik Meinsberg GmbH:

- Aufbau eines regionalen Entwicklungs- und Applikationsnetzes für mikrosystemtechnische Sensoren und Aktoren (InnoSachs)
- Entwicklung und Realisierung von Applikationsbeispielen in der Wasseraufbereitung und Gewässerüberwachung (BMBF)

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Die IOM GmbH hat ein umfangreiches Know-how bei der Messung der uv-induzierten Autofluoreszenz von biologisch aktiven Zellen und Geweben. Adressierte Applikationen sind u.a. das Bioreaktormonitoring oder die Charakterisierung der Stoffwechselaktivität von tierischen und menschlichen Geweben bzw. Organen. Der IOM GmbH ist es gelungen, ein sich selbst referenzierendes Verfahren zur Bewertung der Stoffwechselaktivität unter Ausnutzung der charakteristischen Fluoreszenzlebensdauern endogener Fluorophore zu etablieren, und ein robustes und empfindliches Gerät LF402 Metabolic zu entwickeln. Die ständige Verbesserung der Eigenschaften der faser-optischen Sonde wie zum Beispiel Verlängerung der Standzeit beim Einsatz in Gewässern oder Verbesserung der Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion erschließt für das Produkt und das Verfahren neue Anwendungsfelder und damit neue Märkte.

Die molekulare Struktur von Tetraetherlipiden war nicht bekannt. Detaillierte Erkenntnisse über den Mechanismus der Adsorption der Tetraetherlipide gab es ebenfalls nicht. Mit experimentellen Methoden war ein Zugang zu diesen Informationen nur schwer möglich. Erst durch Molecular-Modelling Untersuchungen bei CAM-D Technologies GmbH wurde der Mechanismus der Adsorption der Tetraetherlipide auf Glasoberflächen weitgehend aufgeklärt. Mit diesem Verständnis des Mechanismus auf molekularer Ebene war eine gezielte Optimierung der Tetraetherlipide hinsichtlich der Beschichtungstechnologie als auch der Auswahl der Substanzen möglich. Molecular-Modelling-Computersimulationen haben ebenfalls entscheidend zum Verständnis von mit Polyethylenglycol modifizierten Tetraetherlipid-Schichten beigetragen.

5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Projektkonsortium

Innerhalb des Verbundprojektes bestand eine enge Kooperation zwischen allen Projektpartnern. Bi- und multilaterale Treffen der Verbundpartner dienten dem regelmäßigen Austausch der Informationen und der Dokumentation des erreichten Arbeitsstandes.

Die -4H- JENA engineering GmbH war mit der Gesamtkoordinierung und technischen Leitung des Vorhabens betraut und hatte dementsprechend enge Kontakte zu allen Projektpartnern und dem Projektträger. Durch die Partner MLU und iba wurden die von 4HJE zur Verfügung gestellten Testsubstrate und Komponenten des Gerätesystems (Durchflussmessstrecke) mit TL-Schichten versehen. Die Auswertung der Testreihen zur Schichtstabilität unter applikationsspezifischen Bedingungen erfolgte bei Partner iba (CLSM). Der Feldtest an der Talsperre Neustadt erfolgte unter Organisation und Betreuung durch 4HJE.

Für IOM erfolgte im Rahmen dieses Projekts die TL-Beschichtung der faseroptischen Sensoren und planaren Testsubstraten durch die MLU Halle und das iba in Heiligenstadt. Mit dem iba erfolgten *in vitro*-Messungen zum Zweck der Validierung der Antifouling-Wirkung und für Langzeitmessungen. IOM arbeitete insbesondere eng mit dem iba Heiligenstadt zusammen. Dies erstreckte sich auf die Lieferung von Edelstahlproben für TEL-Beschichtungen und auf die Anpassung der faser-optischen Sonden ebenfalls für eine verbesserte Antifouling-Beschichtung. Darüber hinaus konnte IOM vorteilhaft das Know-how und die Möglichkeiten des iba Heiligenstadt bei der Fragestellung der Detektion von Zellmonolayern nutzen. Bei der Bearbeitung des Arbeitspunktes „Wartungs- und Kontrollsystem für die Antifouling-Beschichtung“ wurden rege Gedanken, Ergebnisse und sonstige Informationen ausgetauscht.

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Im Rahmen des Verbundprojektes bestand eine enge Zusammenarbeit zwischen allen Projektpartnern. Die Sensortechnik Meinsberg GmbH arbeitete dabei insbesondere mit der Martin-Luther-Universität Halle und dem IBA Heiligenstadt zusammen. Von der MLU bzw. IBA wurden die von Sensortechnik Meinsberg zur Verfügung gestellten Sensoren und Sensorkomponenten mit Caldarchaeol (CL) und dessen Modifikationen bzw. mit GDNT beschichtet. Nach Prüfung der Eigenschaften der beschichteten Materialien durch STM im Labor (Funktionalitätsprüfung und für ausgewählte Materialien EIS-Charakterisierung) erfolgte eine Rückkopplung mit der beschichtenden Einrichtung zur Anpassung der Beschichtungstechnologie an die jeweilige Sensorkomponente und ihrer iterativen Verbesserung. Außerdem beschichtete MLU zu Ende des Projektes eine größere Anzahl von Sensoren und Sensorkomponenten von STM mit den aussichtsreichsten CL-Modifikationen für abschließende Feldtests bei STM. Von IBA wurden weiterhin Fouling-Untersuchungen an von STM beigestelltem Probenmaterial durchgeführt. Regelmäßige Treffen der Verbundpartner dienten dem Informations- und Erfahrungsaustausch sowie der Dokumentation des erreichten Arbeitsstandes.

Das iba Heiligenstadt entwickelte in enger Kooperation mit der MLU Halle verschiedene Funktionalisierungen des Tetraetherlipids und transferierte die Isolierungs- und Beschichtungstechnologie nach Heiligenstadt. Gemeinsam mit IOM und der Sensortechnik Meinsberg entwickelte das iba neue Adapter zur Beschichtung der Sensormuster und Sonden der laserinduzierten Fluoreszenzmessung. Des Weiteren arbeitete das iba eng mit -4H- JENA engineering GmbH im Rahmen der Feldtests zusammen.

Die CAM-D Technologies GmbH Essen erarbeitete Modelle der Tetraetherlipidschicht in intensiver Kooperation mit der MLU Halle und dem iba Heiligenstadt. Es erfolgten MFD-Simulationen basierend auf den analytischen Ergebnissen der beiden Forschungspartner. Die Ergebnisse flossen in die Interpretation des erreichten Antifouling ein.

In dem Verbundprojekt fand eine ausschließliche Zusammenarbeit mit dem IBA in Heiligenstadt und der MLU in Halle statt. Aufgrund des technologischen Know-Hows im Bereich Wasser-Messtechnik kam es zu einem intensiven Kontakt zwischen der CAM-D Technologies GmbH und dem Projektpartner Sensortechnik Meinsberg.

Andere Stellen

KSI

Alle EIS-Messungen (Elektrochemische Impedanzspektroskopie) wurden am „Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik e.V.“ (KSI) in Meinsberg durchgeführt, das hier (dem Projektantrag entsprechend) als Fremdleister der Sensortechnik Meinsberg GmbH fungierte.

Thüringer Fernwasserversorgung - Anstalt des öffentlichen Rechts

Seitens der Thüringer Fernwasserversorgung wurde großes Interesse an der Entwicklungsaufgabe und Bereitschaft zur Unterstützung bekundet, da durch Biofouling verursachte Schäden und Wartungsaufwendungen in der Trinkwassergewinnung besonders gravierend sind. So wurden für die umfangreichen Labortestreihen Isolate von Aufwuchsorganismen und Rohwasserproben von einer Thüringer Talsperre genutzt. Die Untersuchung der Antifoulingwirkung der entwickelten Schichten auf TL-Basis unter Feldbedingungen erfolgte an der Trinkwassertalsperre Neustadt/ Thüringen, wofür freundlicherweise durch die Thüringer Fernwasserversorgung eine Genehmigung erteilt wurde.

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

6 Erzielte Ergebnisse

Investitionen

iba

Mikromanipulator

Für die kolloidale Kraftspektroskopie mittels Rasterkraftmikroskopie ist es erforderlich, spitzenlose Cantilever mit Microbeads zu modifizieren. Nur wenn es gegeben ist, dass das Anheften der Microbeads exakt zentriert am vorderen Ende des Cantilevers erfolgt, können reproduzierbare Messungen durchgeführt werden. Um dies zu gewährleisten, wurden ein hydraulischer Mikromanipulator sowie ein Mikroskop angeschafft.

Präparationsarbeitsplatz + Xeradexlampe

Es erfolgte die Konzeption eines parallelen Lipidpräparations- und Aktivierungsarbeitsplatzes unter der Maßgabe, eine größere Menge Tetraetherlipids effektiv aus bakterieller Rohmasse zu isolieren, zu extrahieren und chromatografisch aufzureinigen. Dabei kann das Equipment für die Aufarbeitung der Rohmasse verschiedener Archaeabakterien eingesetzt werden. Zusätzlich ist das Handling einer vielfachen Menge an Tetraetherlipid möglich. Für die notwendige Oberflächenaktivierung werden Xeradexlampen eingesetzt.

Umbau Laborbioreaktor

Die *in vitro*-Bioadhäsionsprüfung von Antifoulingsschichten ist unabdingbar gekoppelt an den Einsatz von Laborfermentoren. Diese dienen der Präkultivierung biologischer Testsysteme unter definierten Umgebungsbedingungen sowie der kontinuierlichen Kultivierung der bakteriellen Applikationsmodelle während der mehrtägigen Testreihen. Da im iba Heiligenstadt die notwendigen Laborfermentoren bereits vorhanden sind, wurde eine Aufrüstung der Geräte mit der passfähigen und notwendigen Steuereinheit durchgeführt. Nur so konnte die für die geplanten Untersuchungen notwendige Geräteperformance sichergestellt werden. Die Aufrüstungen wurden in die verfügbaren Systeme integriert.

Rechenarbeitsplatz

Arbeitspaket 5 beinhaltet zum einen die Entwicklung eines praxisnahen Prognosemodells auf der Basis einer theoretisch manifestierten und experimentell abgesicherten Bewertung des Antifoulingpotenzials sowie zum zweiten die Erstellung einer Biofilmsimulations-Software als eigenständiges Programm mit Bezug zu relevanten Eingangsgrößen der Biofilmbildung. Beide Arbeitsfelder werden parallel abgearbeitet und bedürfen einer umfangreichen Unterstützung durch entsprechende Hardware. Erst der Einsatz von 64Bit-Prozessoren ermöglicht eine breitere und schneller Informationsverarbeitung, welche durch die Vernetzung beider Workstations zu einem Rechencluster zusätzlich gesteigert werden kann.

Unteraufträge

iba

Patentrecherche

Die Lösung der wissenschaftlichen Problemstellung basiert auf der Nutzung von archaealen Tetraetherlipiden, die eine ideale chemische Plattform mit einem hohen Maß an selektiver Modifizierbarkeit bieten. Im Rahmen der in einem Vorgängerprojekt durchgeführten Arbeiten entstand eine patentfähige Lösung (vorliegendes Patent). In den laufenden Projektarbeiten entstand nun ein aus heutiger Sicht vielversprechenderes Antifoulingkonzept basierend auf der energetischen Entkopplung von Oberflächen durch geordnete Wasserstrukturen (Hydrogele).

					
bmb+f	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Der neuartige Schichtaufbau ermöglicht zudem eine einfachere technologische Umsetzung durch die Nutzung wässriger Chemie. Durch die Projektpartner wird nun eine Patentierung dieser Neuentwicklung angestrebt. Da die Konkurrenzsituation auf dem Gebiet des Antifouling und der Nutzung von Hydrogel-Schichten deutlich komplexer ist, wurde eine aktualisierte Patentrecherche auf dem Gebiet der markt- und patentrelevanten Antifoulingverfahren auf Hydrogelbasis in Kopplung mit archaealen Tetraetherlipiden genutzt.

6.1 Synthese der Tetraetherlipidschicht

Ziele des Arbeitspaketes

- Gewinnung der Tetraetherlipide aus der Biomasse verschiedener archaealer Gattungen
- Konzeption und Aufbau eines nasschemischen Arbeitsplatzes begleitet von einer quantitativen und qualitativen vergleichenden Analyse der Gewinnungsverfahren
- Transfer supportfixierter Lipidschichten auf verschiedene Substrate, wobei für die Übertragung durch Selfassembling-Techniken für Beschichtungen sehr hoher Güte sowie darüber hinaus das Sprüh- und Tauchverfahren in Frage kommen
- Funktionalisierung der Lipidschicht zur gezielten Erzeugung geordneter Wasserstrukturen z.B. über die Kopplung hydrophiler bipolare Moleküle bzw. kosmotroper Agenzien und darüber hinaus über die Bindung von Polyethylenglykol in unterschiedlichen Kettenlängen und Konformationen

6.1.1 Gewinnung des Lipids

MLU

Natürliche Lipidquellen

Die Lipidierungsstrategie basierte während der gesamten Laufzeit des Projektes auf dem Hauptmembranlipid von Archaeobakterien vom Stamm *Thermoplasma acidophilum* (IFB Halle). Aus der Biomasse wurde durch saure Hydrolyse und Abspaltung aller Kopfgruppen der Tetraetherlipid-Grundkörper Caldarchaeol isoliert. Es konnte gezeigt werden, dass auch aus der bakteriellen Rohmasse von Archaeobakterien der Gattungen *Sulfolobus* (Surface & Interface Technologies GmbH (S.I.T.)) sowie *Picrophilus* (IFB Halle) auf ähnliche Weise Caldarchaeol erhalten werden kann. Damit wurden erfolgreich weitere Lipidquellen erschlossen. Aus der Biomasse von Archaeobakterien der Gattung *Picrophilus* (IFB Halle) kann das Caldarchaeol in sehr guter Qualität gewonnen werden, da nach der Hydrolyse weniger Nebenprodukte im Rohlipid enthalten sind und dadurch die chromatografische Reinigung einfacher ist. Die *Picrophilus*- Archaeobakterien benötigen allerdings für ihr Wachstum im Vergleich mit dem *Thermoplasma*-Stamm noch drastischere Bedingungen und sind deshalb aus technischer Sicht problematischer.

Aus der bakteriellen Rohmasse von Archaeobakterien der Gattung *Sulfolobus*, das als „Abfallprodukt“ bei der Erzbearbeitung anfällt und deshalb kostengünstig zu haben ist, werden neben 10% Caldarchaeol etwa 90% Glycerol-Dialkyl-Nonitol-Tetraetherlipid (GDNT) gewonnen. Das GDNT ist ein Tetraether, dessen Kopfgruppen verschieden sind (eine primäre OH-Gruppe, ein cyclisches Polyol). Dieses unsymmetrisch substituierte Tetraetherlipid eröffnet im Vergleich mit dem symmetrisch gebauten Caldarchaeol die interessante Möglichkeit zu einer ganz anderen Kopplungschemie und ermöglicht damit veränderte Oberflächeneigenschaften.

Das Caldarchaeol wird in einem Reaktionsschritt in sein Dicyanurylderivat überführt (aktiviert) und nach chromatografischer Reinigung direkt für das Oberflächencoating eingesetzt.

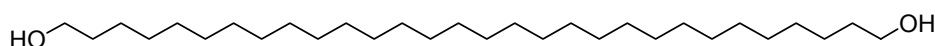
Synthetische Lipide

Ein Ziel der Arbeiten in Halle war neben der Bereitstellung von Lipiden aus natürlichen Quellen die Suche nach leicht und kostengünstig herzustellenden Substanzen mit Selbstassemblierungseigenschaften, die denen des Tetraetherlipids möglichst nahe kommen. Das Molekül sollte folglich ca. 4 nm lang sein, über ein versteifendes Element Y in der Mitte verfügen, das eine Rückfaltung minimiert oder verhindert, und zwei reaktive Kopfgruppen besitzen. Es war nicht das angestrebte Ziel, das Tetraethergrundgerüst auf synthetischem Weg nachzubilden.

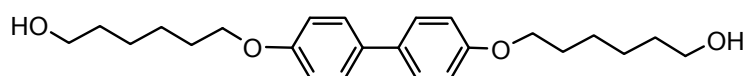


Im Vergleich mit Substanzen mit versteifender Gruppe Y im Molekül sollen auch die Eigenschaften von Modellverbindungen ohne versteifendes Element Y auf Materialoberflächen getestet werden. Die folgenden Substanzen wurden synthetisiert, nach Umwandlung in die Dicyanurylderivate auf Modelloberflächen (Glas-Objektträger) aufgebracht und zur Testung zum IBA geschickt.

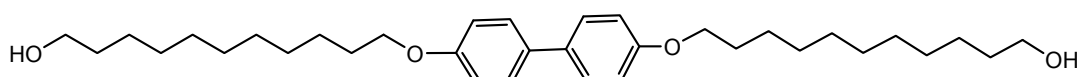
1. Triacontandiol (C_{30})



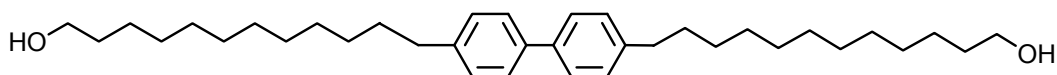
2. 4,4'- Bis(6 -hydroxyhexyloxy) biphenyl



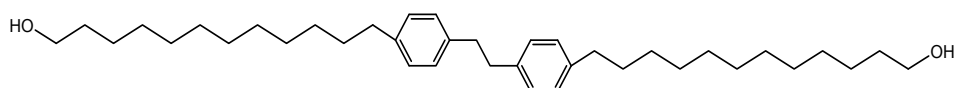
3. 4,4'- Bis(12-hydroxyundecyloxy) biphenyl



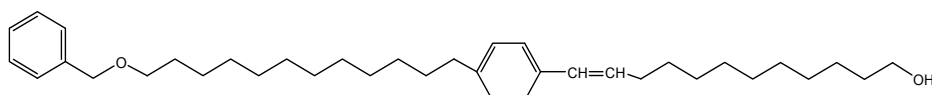
4. 12-[4'-(12-Hydroxy-dodecyl)-biphenyl-4-yl]-docosan-1-ol



5. 1,2-Bis[4-(12-hydroxydodecylphenyl)]ethan



6. 12-[4-(12-benzyloxy-dodecyl)-phenyl]dodec-11-en-1-ol



Die synthetischen Einketter bilden auf Glas und Si-Wafer zwar stabile Schichten, sind in ihren Eigenschaften (Schichtdicke bzw. Randwinkel) den natürlichen Tetraetherlipiden allerdings weit unterlegen. Der zum Teil recht hohe Syntheseaufwand macht die synthetischen Einketter nicht zu echten Alternativen zu den natürlichen Tetraetherlipiden.

Tab. 1: Schichtdicke und Kontaktwinkel auf Einketter-Schichten

Substanz	Schichtdicke (auf Si-Wafer)	Kontaktwinkel (auf Si-Wafer)
Dialkohole	1,1 nm	60°
Biphenyl-Derivate	1,5 nm	60°
CyCl-Caldarchaeol	2,1 nm	75°

6.1.2 Lipidierungsmethodik

iba

Im iba Heiligenstadt stand neben dem Transfer der Lipidierungsprotokolle für das Caldarchaeol die Entwicklung alternativer Methoden für die kovalente Immobilisierung der GDNT-Lipide im Fokus der Arbeiten. Es wurden mehrere Strategien für die kovalente Immobilisierung von GDNT entwickelt, welche in der nachfolgenden Übersicht zusammengefasst werden:

Tab. 2: Strategien zur kovalenten Immobilisierung des GDNT

	<i>ungerichtete Fixierung (Cyanurchloridmethode)</i>	<i>gerichtete Fixierung (Bindung am Nonitolring)</i>	<i>wässrige Immobilisierung</i>
Vorbehandlung der Oberfläche	Cyanurchlorid-aktiviert	NH ₂ - funktionalisiert	Dopamin beschichtet
Vorbehandlung GDNT	keine	Schutzgruppe p-NPCF (p-Nitrophenylchloroformat)	Phosphat
Exponierte Gruppe	Hydroxyl	Carbonat	Phosphat
Analyse	Nachweis der Beschichtung mittels CLSM-Mikroskopie	Nachweis der Schutzgruppe mittels FTIR	Nachweis der Beschichtung mit FTIR, CLSM und AFM
	Kontaktwinkel 60 – 70°	Nachweis der Beschichtung mit Toluidinblau	Kontaktwinkel 85°-100°
bisher beschichtete Oberflächen	Borosilikatglas B33 Si-Wafer Biochips	Kontaktwinkel 92° Borosilikatglas B33 Si-Wafer poröse Glasbeads	Borosilikatglas B33 Silikon, PEEK, PTFE, Titan, Edelstahl
Vorteile	Einfach, schnell	Definierte Ausrichtung der Lipide	wässrig, schnell, für viele Materialien

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

MLU

Eine berichtspflichtige Hauptaufgabe betrifft die Weiterentwicklung der Beschichtungstechnologie

- durch eine schonende Präaktivierungsprozedur
- Tauch- und Sprühverfahren sollen getestet werden
- durch ein Verfahren für ein einfaches und umweltfreundliches Aufbringen der Schicht.

Die während des Projektes zum Einsatz gekommene Technologie zur Lipidbeschichtung von Borofloatgläsern ist gut etabliert und gliedert sich in die Präaktivierung der Materialoberfläche, die im allgemeinen durch 5 minütige Bestrahlung aus 5 mm Abstand mit UV/Ozon (Xeradexverfahren) erfolgt und die anschließende mehrstündige Beschichtung in der Regel mit Cyanuryllipiden in einer geschlossenen Teflonkammer bei 70°C. Um diese zeitaufwändige Lipidierung zu umgehen, wurde stets nach Möglichkeiten zur Optimierung gesucht.

Es ist erstens gelungen, das zu Projektbeginn ausschließlich verwendete toxische und umweltbedenkliche Lösungsmittel Chloroform durch Cyclohexan, gegebenenfalls durch Aceton (für Capsum-Membranen STM) oder Mischungen beider Lösungsmittel zu substituieren. Cyclohexan hat sich hinsichtlich Lipid-Löseeigenschaften und Siedepunkt als besonders geeignet herausgestellt.

Zweitens wurden alternativ Tauch- und Sprühverfahren getestet. Erfolgreich verlief das Besprühen einer aktivierten (UV-bestrahlten) Glasoberfläche mit verdünnter Lipidlösung und einem anschließenden Temperschnitt (120 min bei 90°C).

Drittens gelingt die Lipidierung in einer alternativen Methode mit dem unmodifizierten Caldarchaeol, wenn die Materialoberfläche zuvor mit Cyanurchlorid zur Reaktion gebracht wurde. Die Synthese des Cyanuryl-caldarchaeols entfällt bei dieser Methode, allerdings muss die weitere Modifizierung des Lipids an der im Vergleich mit der Cyanurylgruppe weniger reaktiven Hydroxylgruppe erfolgen.

Viertens konnte in der zweiten Hälfte des Projektes eine wichtige Vereinfachung des Beschichtungsverfahrens erreicht werden: Neue Kopfgruppen am Caldarchaeol ermöglichen das Arbeiten im wässrigen System, bei Raumtemperatur, ohne Einsatz bedenklicher organischer Lösungsmittel oder einer geschlossenen Kammer und bringen eine enorme Zeitersparnis. Damit konnte jetzt erstmals eine sehr einfache Lipidierungsmethode entwickelt werden – quasi eine Methode für Jedermann! Nur durch einfaches Tauchen in die wässrig/alkoholische Mischung des Lipids bei Raumtemperatur wird ein fest haftendes Oberflächencoating erreicht.

Dieses einfach handhabbare Verfahren wird durch neue reaktive Kopfgruppen ermöglicht, die die bewährte Möglichkeit zur Kopplung der Tetraetherlipide über den Cyanurchlorid-Linker beträchtlich erweitern.

Die Kopplung des Lipids an Materialoberflächen aus wässriger Lösung wurde im Hinblick auf die Anforderungen der Projektpartner und den zu beschichtenden polymeren Werkstoffen (PEEK, PVC, PMMA) in der zweiten Projekthälfte verstärkt in Angriff genommen. Diese enorme Herausforderung konnte nur durch die Synthese neuer Caldarchaeolderivate gelingen. Mit der erfolgreichen Herstellung des Caldarchaeolphosphates lag zum ersten Mal eine Substanz mit den folgenden bemerkenswerten Eigenschaften vor:

- bildet in Wasser/Isopropanol Mizellen/Liposomen, die bei Kühlschranklagerung mehrere Wochen stabil sind
- bindet dauerhaft an Amino- und oxidische Oberflächen
- bildet etwa 4 nm „dicke“ Schichten (Siehe folgendes Bild) mit Randwinkel oberhalb von 85°

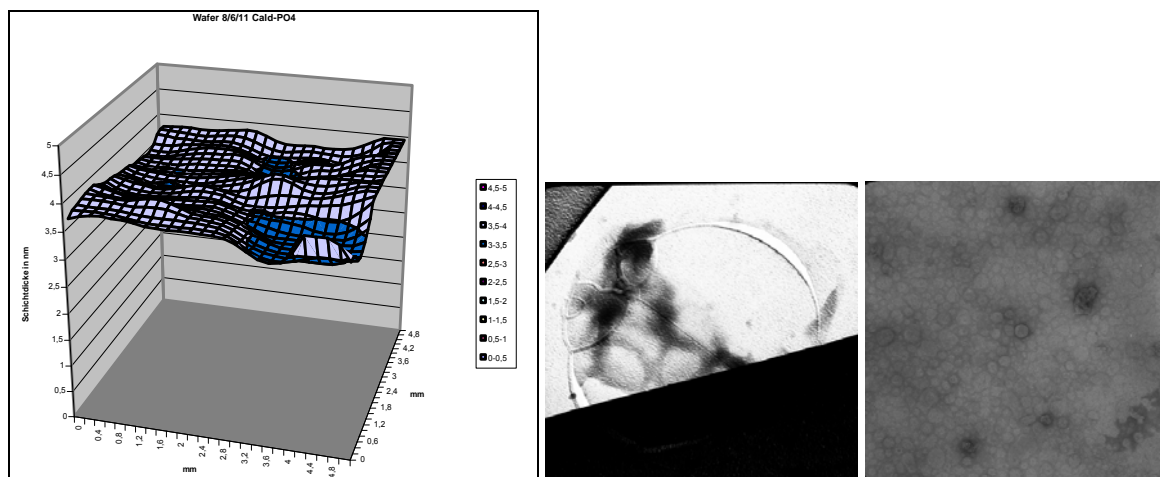


Abb. 1: Caldarchaeoldiphosphat auf Si-Wafer, Ellipsometrie, ELMI –Aufnahme, Gefrierbruch-Aufnahme

Erst durch die Verwendung von Alkohol als Kosolvens konnten unerwarteter Weise sowohl das hydrophobe, unsubstituierte Caldarchaeol, das GDNT als auch das Caldarchaeol mit Cyanurchlorid-Kopfgruppen ins wässrige System gebracht werden. Die Teilchen sind über längere Zeit stabil, selbst nach Entfernung des Alkohols durch Dialyse. Das Dicyanurylcaldarchaeol reagiert auch aus wässrig/alkoholischer „Lösung“ mit Aminogruppen an Materialoberflächen und bildet stabile Schichten.

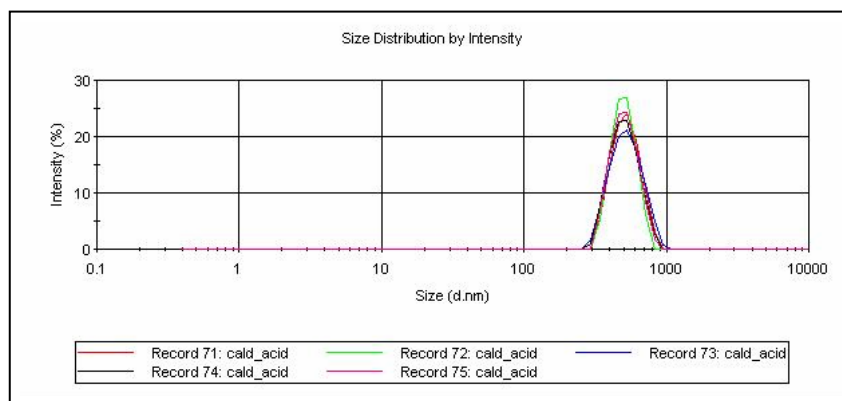
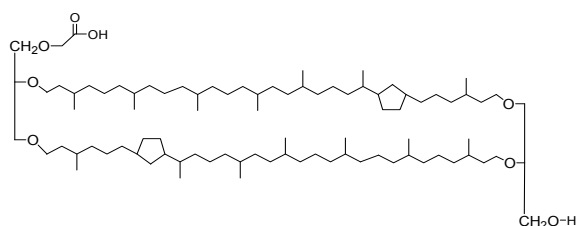
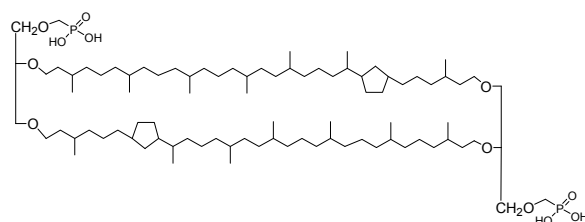


Abb. 2: Teilchengröße von Caldarchaeoldicarbonsäure von etwa 530 nm in Wasser/ Isopropanol.
Nach der Entfernung des Alkohols werden die Teilchen kleiner (etwa 200 nm)

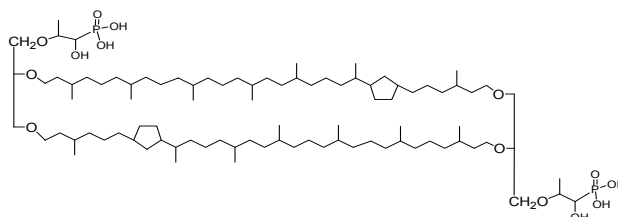
Es gelang weitere, neue, Erfolg versprechende und reaktive Kopfgruppen am Caldarchaeol zu synthetisieren: Im wässrigen System sollte nicht nur das Caldarchaeol mit Phosphatkopfgruppen „löslich“ sein, sondern auch Derivate, die andere funktionelle Gruppen wie z.B. Carboxylgruppen besitzen. Um diese Zielverbindung zu erhalten, wurde Caldarchaeol im ersten Schritt mit Butyllithium umgesetzt und das Lithiumalkoholat erhalten. Die weitere Reaktion mit dem Natriumsalz der Chloressigsäure führte zur Bildung der Carboxymethylverbindung:



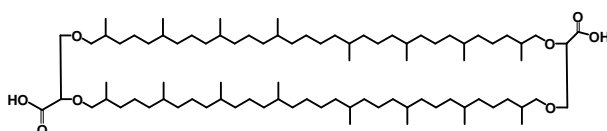
Die Reaktionsführung gestattet es, sowohl das disubstituierte Produkt als auch das in der obigen Formel gezeigte Monosubstitutionsprodukt zu gewinnen. Diese neue Substanz kann wie das Caldarchaeolphosphat in ein wässriges System überführt werden, aus dem es als Aktivester insbesondere mit Aminogruppen an Oberflächen reagiert. Damit liegt jetzt eine ausgearbeitete Vorschrift zur Umsetzung von Caldarchaeol mit Butyllithium vor. Das dabei entstehende Lithiumalkoholat stellt eine neue Schlüsselverbindung dar, denn diese kann Ausgangspunkt für die Synthese weiterer Derivate sein, um z. B. Phosphonatgruppen in das Molekül einzuführen, von denen bekannt ist, dass sie besonders gut an Oberflächen haften. Im letzten Projektjahr gelang die Synthese dieser Verbindung durch Reaktion des Lithiumalkoholats von Caldarchaeol mit Chlormethylphosphonsäurediethylester.



Alternativ kann die Phosphonatgruppe durch Umsetzung von Caldarchaeol mit Fosfomycin eingeführt werden. Fosfomycin ist ein Antibiotikum und verfügt über einen reaktiven Epoxidring.



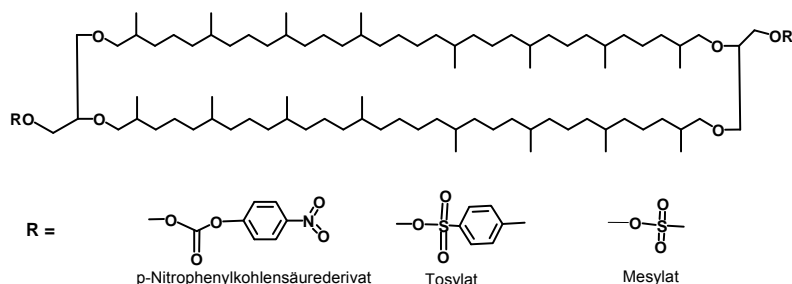
Die direkte Umwandlung der Hydroxylgruppen des Caldarchaeols in Carboxylgruppen durch übliche Reaktionen (mit Schwermetallsalzen wie KMnO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; mit HNO_3 allein oder in Kombination mit H_2O_2 , mit Oxon, mit IBX) gelang nicht – entweder erfolgte überhaupt keine Reaktion oder der Tetraether wird aufgebrochen, wenn man das Oxidationsmittel im Überschuss einsetzt oder die Reaktionszeit ausdehnt. Erst in der Projektverlängerung konnte die Caldarchaeoldicarbonsäure durch die Verwendung des katalysierten Hypochlorit/ Chlorit-Systems in schonender Reaktion und sehr guten Ausbeuten erhalten werden.



Es steht nun eine ganze Palette neuer Substanzen zur Verfügung, die in wässrig/ alkoholischem Medium Mizellen/ Liposomen bilden, über reaktive Kopfgruppen verfügen und an Substraten binden können.

Die Cyanurchloridkopfgruppe am Caldarchaeol ist nicht sehr reaktiv und erfordert für die Bindung an Oberflächengruppen erhöhte Temperaturen sowie relativ lange Reaktionszeiten, deshalb wird weiterhin nach Alternativen gesucht: Eine insbesondere für Glas- und keramische Oberflächen sehr gut geeignete Kopfgruppe ist die Silylgruppe. Die Synthese des entsprechenden Triethoxysilyl-Caldarchaeols gelingt leicht durch Umsetzung von Caldarchaeol mit Triethethoxychlorsilan.

Beschichtungsversuche mit der neuen Substanz an Modelloberflächen (Si-Wafer) zeigen, dass durch Variation von Temperatur und Zeit unterschiedlich „dicke“ hydrophobe Schichten erzeugt werden können. Mit zunehmender Schichtdicke nimmt allerdings die Tendenz zur Ablösung der Schicht z. B. bei Ultraschallbehandlung zu. Durch Umsetzung von Caldarchaeol mit Mesylchlorid, Tosylchlorid und p-Nitrophenylchloroformat konnten weitere neue Substanzen mit reaktiven Kopfgruppen synthetisiert werden, die insbesondere leicht mit Amingruppen an Oberflächen reagieren.



Die reaktiven Kohlen säureester-Kopfgruppen sowie die Mesyl- und Tosyl-Gruppe sind allesamt gute Abgangsgruppen. Diese drei neuen Substanzen stellen deshalb hervorragende Schlüsselverbindungen für die Synthese weiterer oberflächenaktiver Caldarchaeole dar.

Alle neuen Substanzen sind durch Massenspektrometrie, IR- und Multikern-NMR-Spektroskopie eindeutig charakterisiert.

Darüber hinaus wurden einige Reaktionen am GDNT getestet. Durch eine einfache Reaktion mit Aceton können die sekundären Hydroxylgruppen des Polyols blockiert werden, so dass dann nur noch die primären Hydroxylgruppen für Folgereaktionen zur Verfügung stehen. Diese Reaktionen verlaufen dann ohne unerwünschte Nebenreaktionen, die ohne Blockierung der sekundären Hydroxylgruppen nicht verhindert werden können. Die folgenden Umsetzungen am GDNT wurden erfolgreich getestet:

- mit POCl_3 zum GDNT-monophosphat
- mit Cyanurchlorid zum Monocyanuryl-GDNT (ohne Polymerisation als Nebenreaktion)
- mit Hypochlorit/ Chlorit zur Carbonsäure (ohne Aufspaltung des Polyols)

6.1.3 Entwicklung sterisch barrierebildender Schichten

iba

Die Funktionalisierungsstrategie orientiert sich zwingend an den, infolge der vorhergehenden Immobilisierung entstehenden, nach außen exponierten funktionellen Kopfgruppen.

Zur Funktionalisierung der Hydroxylgruppen von GDNT oder Caldarchaeol steht nun neben der eingeführten Cyanurchloridmethode ein weiteres Verfahren zur Verfügung: die Umsetzung mit p-Nitrophenylchloroformat (pNPCF). Diese Reaktion verspricht neben einer raschen und annähernd quantitativen Funktionalisierung der Lipide zusätzlich eine quantitative Reaktionskontrolle, deren grundsätzliche Durchführbarkeit an einem Modellversuch gezeigt werden konnte. Die Zugabe des Farbstoffes Toluidinblau führte zur Freisetzung des gelben Farbstoffes para-Nitrophenol und ermöglicht so grundsätzlich die Quantifizierung der Anbindung von Funktionsmolekülen (Abb. 3). Die Funktionalisierung des ungerichtet fixierten GDNT konnte am Beispiel der Bindung von PEG 3000-Amin dargestellt werden.

Diese Methode wurde ebenfalls für die Funktionalisierung des gerichtet immobilisierten GDNT etabliert, dessen exponierte Gruppe eine Carbonatgruppe ist.

Die nachträgliche Funktionalisierung des GDNT, welches über die wässrige Chemie immobilisiert wurde, wird über NH_2 -Gruppen des zu bindenden Funktionsmoleküls z.B. der Zuckermoleküle, des Diaminopolyethylenglykol oder eines beliebigen Protein. FTIR/ATR-spektroskopische Analysen demonstrierten die Machbarkeit am Beispiel der Kopplung von Lysozym an das GDNT.

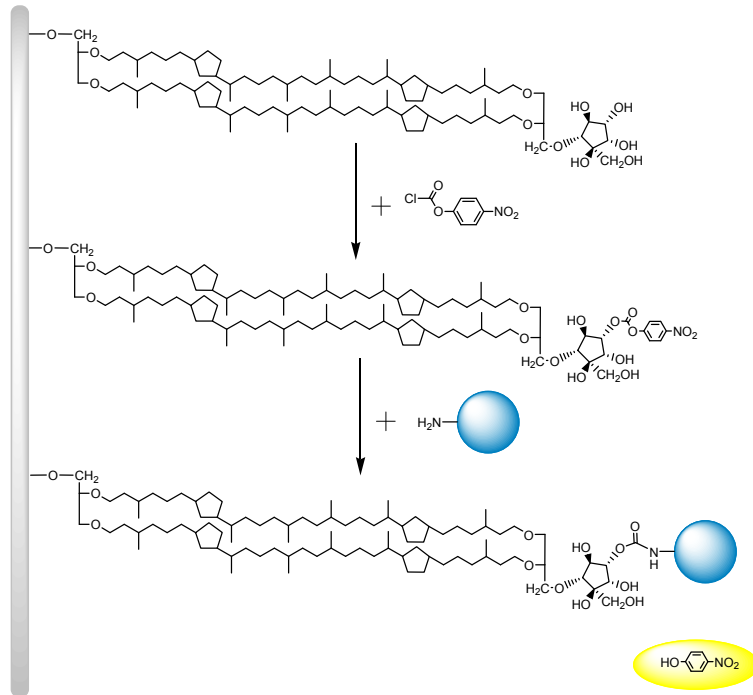


Abb. 3: Funktionalisierung der gewonnenen Lipidschichten mit Reaktionskontrolle

MLU

Eine berichtspflichtige Aufgabe besteht in dem Beitrag zur „Entkopplungsstrategie“ durch

- hauptsächlich durch PEG-ylierte-Tetraetherlipide
- durch Modifizierung mit kosmotropen Substanzen (Ectoin, Trehalose, Phenylboronsäure)
- durch Derivate mit Phenylboronsäureköpfen (Untersuchung der zuckerkomplexierenden und wasser-strukturierenden Wirkung an Oberflächen)

Die in Halle genutzte Strategie zur Erzeugung barrierebildender Schichten basiert auf einem sequenziellen 2-Schrittverfahren: erst wird das Lipid an die jeweilige Oberfläche gekoppelt, dann erfolgt in einem 2. Schritt die Modifizierung der noch freien, aus der Lipidschicht nach außen ragenden Cyanurchlorid-Kopfgruppe durch z.B. Polyethylenglykol (PEG) (MG: 1500, 3000 und 10000) oder kosmotrope Substanzen.

In der Literatur besteht Konsens in der Auffassung, dass PEG einen entkoppelnden Effekt bei Schichtdicken ab 3 nm erreicht. Die ursprüngliche Vorstellung, dass durch die Anbindung von PEG-Oligomeren mit zunehmender Kettenlänge eine stetig wachsende geordnete Wasserschicht erreicht wird, erscheint durch zahlreiche Untersuchungen an Si-Wafern mittels ellipsometrischer Schichtdickenkontrolle fragwürdig, denn unabhängig von dem eingesetzten PEG wurden nur Schichtdickenveränderungen von 1 bis 2 nm gefunden.

Zur Lösung dieses Problems wurde sehr viel Zeit investiert und umfangreiche Versuche zur Schichtdickenvariation an PEG unternommen:

- Variation der primären Oberflächenbelegung/ -aktivierung (UV/ Ozon, CyCl-TEL, CyCl, Aminosilan, Dopamin, Carbonyldiimidazol, Polylysin)
- Variation des Lösungsmittels (Chloroform, Chloroform mit Natriumcarbonat, Picolin, Boratpuffer (0,01M bis 1M) pH 8,8, Wasser)
- Variation der PEG - Kettenlänge (MW 750, 1500, 3000, 5000, 10000)
- Variation der Substituenten am PEG (NH₂-PEG-OH, NH₂-PEG-NH₂, NHS-PEG-NHS, CyCl-PEG-CyCl, Boc-PEG-NHS, CH₃O-PEG-NHS, CH₃O-PEG-CyCl)
- Variation der Reaktionsbedingungen
 - Temperatur (4°C bis 70°C)
 - Reaktionszeit (15 Minuten bis 20 Stunden)
 - Konzentration (1 mg/ml bis 100 mg/ml)
- Zugabe von Salz (0,5 M Kaliumsulfat)

Es gelingt jedoch mit den aufgeführten Verfahren nicht, Schichtdicken oberhalb 3 nm zu realisieren. Auf Grund der sich bereits früh abzeichnenden Beobachtungen wurde auf dem Projekttreffen am 23. August 2007 in Halle festgelegt, die Modifizierung der hydrophoben Lipidschicht durch PLL-PEG (an MLU synthetisiert, da nicht kommerziell erhältlich) durchzuführen. Erste Proben wurden bereits 2007 an die Projektpartner übergeben. In der Folgezeit wurde die Modifizierung mit PLL-PEG genauer untersucht unter den folgenden Aspekten:

- PEG-Kettenlänge, PLL/ PEG-Anteile
- Konzentration, pH-Wert, Temperatur, Zusatz von Salz/ Arbeiten am cloud point

Es ist durch die vorgelagerte Reaktion des PEG an PLL erstmalig gelungen, die für eine entkoppelnde Wirkung notwendige Schichtdicke von 5 bis 7 nm zu generieren. Den Projektpartnern wurden Proben mit PLL-PEG (PEG 1500, 3000 und 5000) sowie PLL-PEG (5000) mit 20, 30 und 40 %igem Substitutionsgrad an PEG zur Testung übergeben.

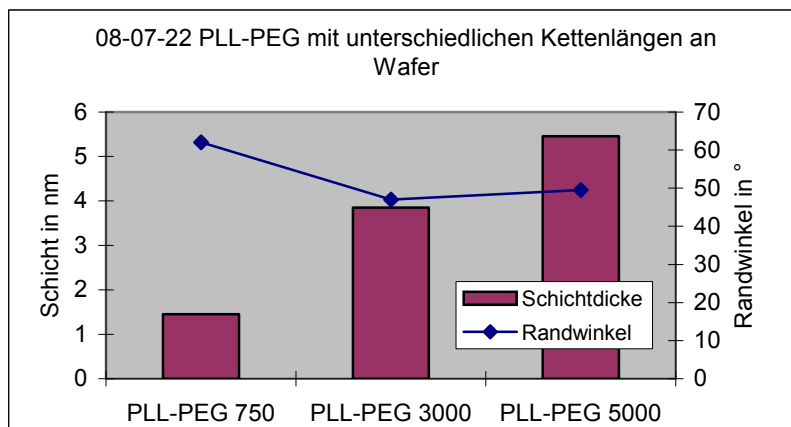


Abb. 4: Schicht PLL- PEG mit Schichtdicke und Wasserkontaktwinkel

Als weitere kosmotrope Substanzen wurden Hydroxyectoin, Aminomannose, Hyaluronsäure sowie Chitosan - alle mit in der Literatur beschriebenen wasserstrukturierenden Eigenschaften - an lipidisierte Modelloberflächen gebunden und Probekörper zur Testung übergeben. Die erfolgreiche Reaktion der aus der Lipidschicht nach außen ragenden Cyanurchloridkopfgruppe mit Aminophenylboronsäure konnte durch Randwinkelmessungen kontrolliert werden.

					
bmb+f	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Die zuckerkomplexierende Wirkung der Boronsäure wird genutzt und mit Trehalose, Inulin und Chitosan weiter umgesetzt. Probekörper mit den hier genannten Modifizierungen wurden den Projektpartnern zur Testung zur Verfügung gestellt. Die erfolgreiche Lipidierung aus wässrigen Systemen sowie die Anforderungen der Praxispartner nach einer möglichst universellen Aktivierung von Kunststoffoberflächen machte die Suche nach einer Oberflächenaktivierung notwendig, die ebenfalls aus Wasser erfolgen kann.

Unter Wasser lebende Muscheln verfügen zur Haftung an Oberflächen über ein spezielles, Dopamin reiches Protein (Literatur: Lee, Haeshin et al. (2006) PNAS 103, 12999ff). Das Dopamin an sich hat die Eigenschaft, auf fast allen Oberflächen sehr fest zu haften und in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur Polydopamin zu bilden, das Schichten bildet. Es ist gelungen, ausgehend von Dopamin in einem sehr einfachen Verfahren aus wässriger Lösung definierte Schichten von Polydopamin zu erzeugen. Die Methode ist einfach und schnell (1h für 10 nm Dicke), liefert reproduzierbare Ergebnisse und die gebildeten Schichten sind stabil gegenüber organischen Lösungsmitteln sowie Ultraschall. Eine Aktivierung der Materialoberfläche etwa durch UV/ Ozon ist nicht zwingend notwendig. Die Polydopaminschicht ist homogen und reaktiv. Werden Si-Wafer, die eine Polydopaminschicht tragen, mit wässrig/ alkoholischen Mizellen/ Liposomen von Caldarchaeol-diphosphat oder Dicyanurycaldarchaeol zur Reaktion gebracht, lässt sich mittels Ellipsometrie ein Anwachsen der Schichtdicke um etwa 4 nm messen. Dieses Resultat sowie die Veränderung des Kontaktwinkels belegen die erfolgreiche Lipidierung. Damit wurde ein Verfahren für die neuen Materialien entwickelt, für die die Praxispartner Anforderungen formuliert haben und die nicht mit organischen Lösungsmitteln behandelt werden können.

6.1.4 Darstellung von Tetraetherlipidschichten

4HJE

Aus dem Applikationsfeld Durchflussmessstrecken für das Gewässermonitoring wurden relevante sensorische, funktionale und konstruktive Substratmaterialien, für die eine Antifoulingbeschichtung in Frage kommt, ausgewählt, die entsprechenden Materialien und Komponenten beschafft und Materialproben von bisher noch nicht beschichteten Werkstoffen (PVC, PEEK, PMMA) sowie die bewährten Standardsubstrate für die Testreihen (Borofloat®33-Slides und -Ronden) den Projektpartnern MLU und iba für Lipidierungsversuche bzw. Beschichtung mit den Tetraetherlipid-Modifikationen zur Verfügung gestellt. In späteren Projektphasen wurden auch 3D-Substrate (Zylinder aus Borosilikatglas) für die Realisierung eines Demonstartionssystems zur Beschichtung übergeben. Aus dem Bereich des Gewässermonitorings wurden Parameter definiert, aus denen folgende Anforderungen an die Darstellung der modifizierten Tetraetherlipidschichten resultierten:

- stabile Verbindung mit dem Trägersubstrat, damit sich die Schicht im bewegten Messmedium (Strömungsgeschwindigkeiten bis 2 m/s, zum Teil auch 5 m/s) nicht ablöst
- Beständigkeit gegen abrasive Partikel im Messmedium (z.B. Sedimentfrachten bis 500 mg/l mit Partikelgrößen < 20 µm bis 600 µm)
- thermische Beständigkeit (-2 bis 40°C)
- chemische Beständigkeit (diverse Salze, Kohlenwasserstoffe, ...)
- Beständigkeit gegen Sonnenlicht/ UV-Strahlung
- Benetzbarkeit/ ungehinderter Kontakt insbesondere elektrochemischer Sensoren zum Messmedium

IOM

Für die probeweise Beschichtung mit Tetraetherlipid-Schichten wurden Edelstahlproben mit den Abmessungen 75 x 25 x 0,5 mm aus dem Material V2A (DIN 1.4301) hergestellt. Ca. 50 Stück dieser Proben wurden dem IBA Heiligenstadt für Beschichtungsexperimente zur Verfügung gestellt.

Darüber hinaus wurden faseroptische Sonden vom Typ 003-496 (7-Faser-Sonde mit getrennter Anregung/Emission) für die Beschichtung hergestellt. Zum gasdichten Einbringen der Sonde in die Beschichtungskammer wurde am Handstück zusätzlich ein M4-Gewinde angebracht.

STM

Zur Synthese von Tetraetherlipidschichten mit passenden Eigenschaften war eine kontinuierliche Optimierung der Lipideigenschaften für die jeweilige Anwendung vorgesehen. Die Ergebnisse der Charakterisierung beschichteter elektrochemischer Sensoren durch STM (s. Pkt. 6.3.1 und 6.3.4) wurden in die Optimierungszyklen regelmäßig eingebracht.

iba

Die technische Umsetzbarkeit der Beschichtung wurde an speziellen Demonstrationsmustern der Industriepartner nachgewiesen. Hierfür wurden passgenaue Beschichtungsadaptoren konzipiert und hergestellt, welche eine vielseitige Einsetzbarkeit für unterschiedliche Sensortypen und eine lösungsmitteldichte Beschichtung erlauben.

Zudem konnte ein Aufbau für die homogene Beschichtung von Glaszylindern realisiert werden. In die Aufnahmedeckel wurden zusätzliche Aufnahmen für Modellsubstrate integriert, um die erreichte Beschichtungsqualität zu ermitteln.

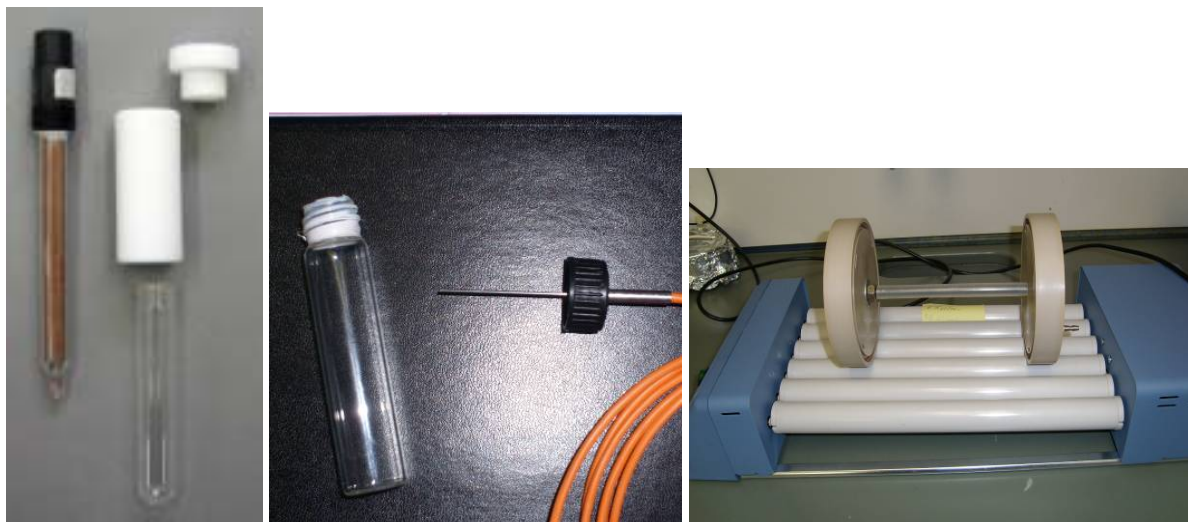



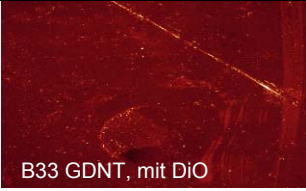

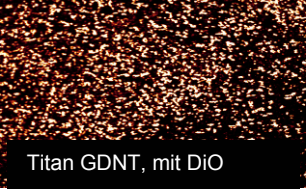
Abb. 5: Beschichtungsadaptoren für verschiedene Sensoren

- a) pH-Elektrode der Sensortechnik Meinsberg GmbH
- b) Fluoreszenzsonde der IOM Berlin
- c) Adapter für Durchflussmodul der -4H- JENA engineering GmbH


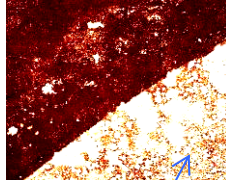
Weiterhin erfolgte die Umsetzung der nasschemischen Beschichtungstechnologien mit GDNT auf die im Anforderungsprofil definierten Werkstoffe. Unter der Vorbedingung der Beständigkeit der Materialien in den benötigten Lösungsmitteln, wie beispielsweise Chloroform, konnte sowohl die

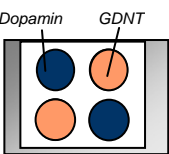
ungerichtete organische als auch die wässrige Beschichtungsmethode auf die Sensorwerkstoffe umgesetzt werden. Die nachfolgenden Übersichten präsentieren neben den getesteten Materialien, die erreichten Nachweise mittels Kontaktwinkelmessung und Fluoreszenzmikroskopie.

Tab. 3: ungerichtete Fixierung des GDNT auf Sensorwerkstoffen

Werkstoff	Kontaktwinkel gereinigt / aktiviert / lipidiert	Beispiel der CLSM-Analyse (DiO-markiert, 1mm breit)	
Borosilikatglas	14° / 0° / 80°		
Quarzglas	14° / 0° / 80°		
Titan	65° / 14° / 65°		
Silikon	94° / 59° / 100°		
Graphit	95° / 42° / 99°		
PEEK	98° / 27° / 85°		
PTFE	105° / 97° / 73°		
PUR	73° / 56° / 89°		

Tab. 4: wässrige Fixierung des GDNT PO4 auf Sensorwerkstoffen

Werkstoff	Kontaktwinkel lipidiert	Beispiel der CLSM-Analyse (DiO-markiert, 1mm breit)	
Borosilikatglas	99°		
Stahl (IOM)	118°		
Si-Wafer	95°		
PEEK	104°		
PTFE	117°		








MLU

Im Projekt erfolgte die Bereitstellung von 327 lipidierten Glas-Objekträgern und 370 B33 Glas-Ronden auf der Basis von beidseitig aktiviertem Caldarchaeol, das weiter modifiziert wurde mit:

- PEG mit MW 1500, 3000, 10000
 - PLL-PEG PEG mit MW 750, 3000, 5000
- PLL-PEG mit PEG-Substitutionsgrad von 20, 30 und 40%
- PLL-(FITC)-PEG mit PEG-Substitutionsgrad 40%
- Aminophenylboronsäure, komplexiert mit Inulin (Polyfructosan), Trehalose, Chitosan
- Hydroxyectoin

Damit wurden alle im Plan vorgesehenen kosmotropen Substanzen für Beschichtungen eingesetzt und zur Testung übergeben. Für die Projektpartner STM und IOM wurden darüber hinaus zahlreiche spezielle Messsysteme und Sensoren lipidiert und nach Wunsch modifiziert. Zusätzlich zum Plan wurden Proben mit den folgenden Substanzen modifiziert:

- Caldarchaeol-Phosphat
- Dopamin, Dopamin modifiziert mit Caldarchaeol-Phosphat

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

- Diverse „Einketter“
- TL + Aminomannose, Chitosan, Hyaluronsäure

6.2 Modellierung

Ziele des Arbeitspaketes:

- Generierung des MFD-Modells der Tetraetherlipide und Berechnung der MFD-Wechselwirkungsparameter und MFD-Simulationen der Aggregation der Tetraetherlipide an Modelloberflächen.
- MFD-Simulation der Adsorption der Tetraetherlipide an realen Oberflächen. Molekulare Analyse der Schichten.
- Modifizierung der Lipid-Moleküle im Computermodell. Optimierung der Lipidmoleküle hinsichtlich des Haftungs- und Enthaftungsvermögens an Oberflächen. MFD-Simulation der funktionalisierten Moleküle und die Bindung mit Bioziden und Nanopartikeln an der „Link-Position“ der Lipide.

6.2.1 Molekulare Analyse der Lipidschichten mittels MM/MD-Simulation

CAM-D

Mit mesoskopischen Computersimulationen sollten in dem Projekt die Hafteigenschaften von Tetraetherlipiden (Tetraetherlipid) auf realen Werkstoffen optimiert und verbessert werden. In Kombination mit experimentellen Arbeiten sollte in dem Projekt ein genaues Verständnis hinsichtlich der Wechselwirkungen und Konformationen der Tetraetherlipide auf molekularer Ebene erhalten werden. Die theoretischen Arbeiten waren eng mit experimentellen Untersuchungen des Institutes für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V., Heilbad Heiligenstadt (iba, Arbeitsgruppen von Dr. Liefeth) und dem Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle (MLU) verbunden.

Die molekulare Struktur von Tetraetherlipiden waren nicht bekannt. Detaillierte Erkenntnisse über den Mechanismus der Adsorption der Tetraetherlipide gab es ebenfalls nicht. Mit experimentellen Methoden war ein Zugang zu diesen Informationen nur schwer möglich. Erst durch Molecular-Modelling Untersuchungen wurde der Mechanismus der Adsorption der Tetraetherlipide auf Glasoberflächen weitgehend aufgeklärt.

Mit diesem Verständnis des Mechanismus auf molekularer Ebene war eine gezielte Optimierung der Tetraetherlipide hinsichtlich der Beschichtungstechnologie als auch der Auswahl der Substanzen möglich. Molecular-Modelling-Computersimulationen haben ebenfalls entscheidend zum Verständnis von mit Polyethylenglycol modifizierten Tetraetherlipid-Schichten beigetragen.

Experimentelle Laboruntersuchungen wurden bei unserem Projektpartner, dem iba in Heiligenstadt durchgeführt. Da das iba federführend im Verbundprojekt tätig war, waren die Ergebnisse der Laboruntersuchungen von zentraler Bedeutung. Der im Projektantrag formulierte Arbeitsplan war Basis der langfristigen Orientierung der Untersuchungen.

Die Computersimulationen basierten auf den Ergebnissen und Auswertungen der Laborexperimente am iba. Es fand ein intensiver Austausch mit dem iba und auch mit der MLU in Halle statt, die Synthesen und analytische Untersuchungen der Tetraetherlipide durchführten. Um flexibel auf die experimentellen Ergebnisse zu reagieren und um die Simulationen mit den Experimenten zu synchronisieren, wurden die theoretischen Berechnungen weitgehend mit den Projektpartnern iba und

Tetraetherlipid-Schicht hat. Die Simulationen konnten diesen Effekt ebenfalls bestätigen.

Es zeigte sich an den molekular aufgelösten Simulationsergebnissen, dass die Homogenität der Monoschicht auf dem Festkörper stark abhängig von der Konzentration des Tetraetherlipide im Lösemittel ist. Die folgenden Abbildungen zeigen Schichten bei niedriger Tetraetherlipid-Konzentration (links) und hoher Tetraetherlipid-Konzentration.

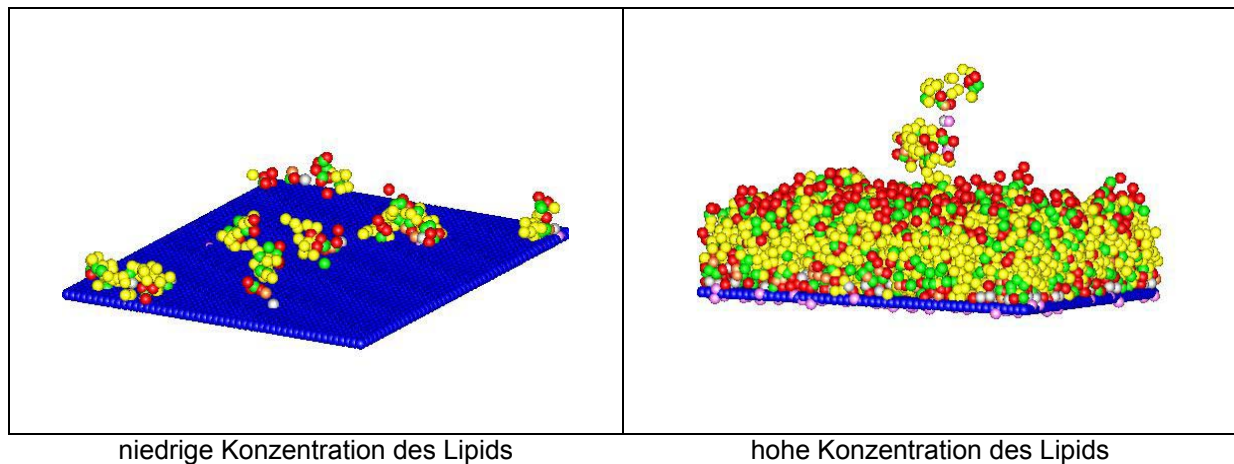


Abb. 7: Simulationsergebnisse mit MFD-Modellen

Weitere Simulationen zeigten, dass sich bei den bi-aktivierten Tetraetherlipide sogenannte Hufeisenstrukturen ausbilden. Sie resultieren aus der Reaktivität an den beiden Endstellen der hydrophoben Kette des Tetraetherlipide und aus der Flexibilität des Moleküls.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeiten war die Erkenntnis, dass Hufeisenstrukturen ungünstig für Antifouling-Beschichtungen sind, da sie nicht mehr für weitere Reaktionen mit Antifoulingwirkstoffen zur Verfügung stehen.

6.2.2 Modellierung und Optimierung des Lipidierungsprozesses durch MFD-Simulation

CAM-D

Experimentelle Daten, die im Labor aufgrund von hochaufgelösten Längen- und Zeitskalen nur schwer zugänglich sind, sollten durch die Computersimulationen interpoliert oder extrapoliert werden. Mit den Informationen über die Lipidstruktur und den Mechanismus der Wechselwirkungen zwischen Lipid und Wirkstoff sollte die Effektivität der Tetraetherlipide als Haftvermittler sowie als Wirkstoffe zur Verbesserung der Antifoulingseigenschaften von Materialien verbessert werden.

Da zur Erzeugung einer wirksamen Antifoulingschicht die mit Tetraetherlipide beschichtete Oberfläche in einem 2. Schritt mit Antifouling-Substanzen funktionalisiert wird, wurden Simulationen von Antifoulingbeschichtungen durchgeführt, die aus dem Tetraetherlipid GDNT bestanden. An GDNT wurde im Experiment und in der Simulation das als Antifouling-Wirkstoff bekannte Polyethylenglykol (PEG) angekoppelt.

Die Untersuchungen sollten insbesondere Erklärungen zur Ursache der experimentell beobachteten Antifouling-Eigenschaften der Tetraetherlipid-PEG-Beschichtungen liefern. In der folgenden Abbildung ist das Simulationsergebnis für das auf Borofloat-Glas gebundene Molekül GDNT(PEG)₂₅ dargestellt.

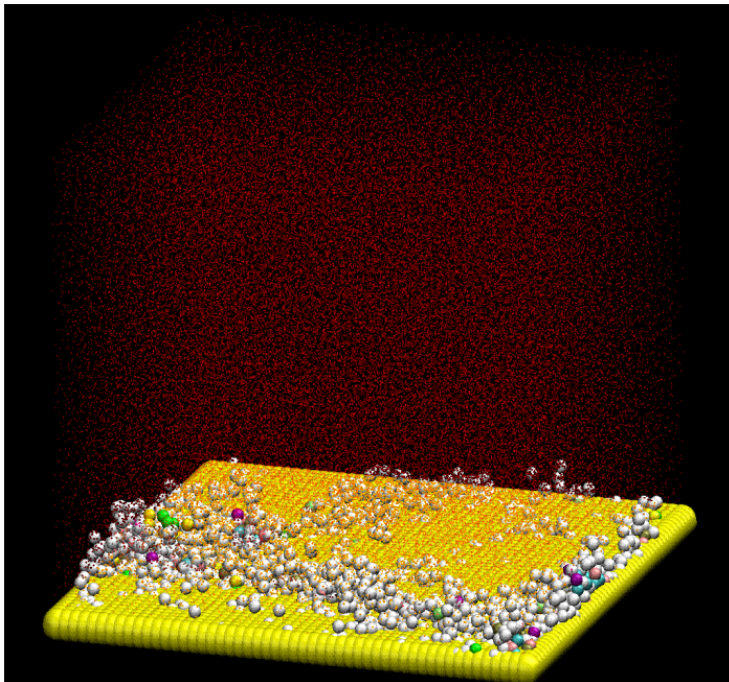


Abb. 8: Simulation des GDNT(PEG)₂₅- Moleküls auf Borofloat

Bei einer relativ niedrigen Konzentration sind die GDNT-PEG-Moleküle nahezu senkrecht zur Oberfläche orientiert. Wasser kann relativ ungehindert die Oberfläche benetzen. Die Konzentrationserhöhung der GDNT-PEG führt zu einer homogen beschichteten Oberfläche.

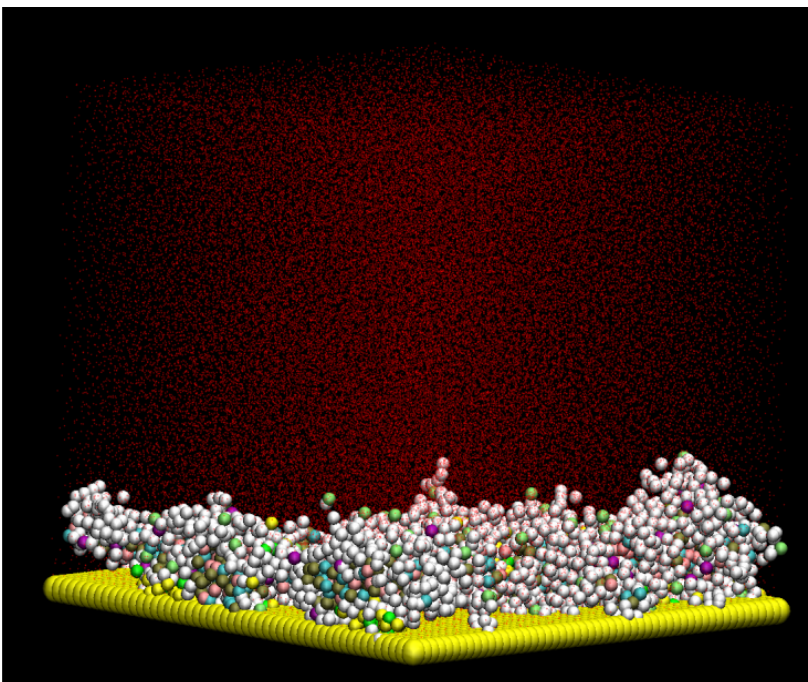









Abb. 9: Simulation des höher konzentrierten GDNT(PEG)₂₅- Moleküls auf Borofloat

Die Simulationsergebnisse zeigten, dass die GDNT-PEG-Beschichtung die Benetzungseigenschaft bzgl. des Wassers deutlich verändert. Dadurch lässt sich ein Antifoulingeffekt erzielen. Diese

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Eigenschaft ist abhängig von der Konzentration und ist vermutlich nur bei ausreichenden Oberflächendichten zu erzielen.

Die erzielten Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Durch die Simulationen wurden grundlegende Einblicke in die molekulare Struktur des Oberflächenfilms erzielt.
- Durch das Verständnis und die Erkenntnis der Bildung von Hufeisenstrukturen wurde gefunden, dass GDNT im Vergleich zu Caldarchaeol ein besseres Tetraetherlipid zur Beschichtung darstellt.
- Weiterhin wurde erkannt, dass inaktive Hufeisenstrukturen durch Einfachfunktionalisierung der Tetraetherlipide vermieden werden können.
- Mit den Untersuchungen zum Einfluss der Tetraetherlipid-PEG-Beschichtung auf die Wasserstruktur konnten die Antifoulingseigenschaften besser verstanden werden.

6.3 Schichtcharakterisierung

Ziele des Arbeitspaketes

- Durchführung der Grenz- und Oberflächenanalytik, wobei laseroptische und scannende Techniken (CLSM, AFM) sowie spektroskopische Methoden (FTIR / Ellipsometrie) zur Anwendung kommen.
- Physikochemische Charakterisierung der Antifoulingsschichten einschließlich der topografischen Charakterisierung, der oberflächenenergetischen und elektrokinetischen Beurteilung ergänzt durch die Aufnahme von Kraft-Abstandskurven mittels Atomkraftmikroskopie
- Materialwissenschaftliche Analysen der Sensorfunktionalität

6.3.1 Grenz- und Oberflächenanalytik

STM

Eine für elektrisch leitfähige Substrate etablierte Methode der Grenz- und Oberflächenanalytik, die auch häufig zur Beurteilung von Deckschichten genutzt wird, stellt die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) dar. Im Rahmen des Teilprojektes von STM wurde deshalb versucht, diese Methode zur vergleichenden Charakterisierung von Oberflächen elektrochemischer Sensoren vor und nach ihrer Beschichtung mit Tetraetherlipiden einzusetzen. Im Ergebnis dieser Untersuchungen sollte gezeigt werden, ob sich Unterschiede zwischen be- und unbeschichteten Sensoroberflächen nachweisen lassen und welches Ausmaß sie aufweisen. Im Falle deutlicher Unterschiede sollten diese Ergebnisse den Ansatz für die Entwicklung eines Wartungs- und Kontrollsystems für Antifouling-Schichten unter Praxisbedingungen darstellen (s. AP 6.6.4).

Alle EIS-Untersuchungen wurden am KSI mit einem Impedanzspektrometer der Fa. GAMRY bei 25 °C durchgeführt (Messanordnung s. Abb. 10). Als Substrate wurden elektronisch leitendes Platin (wie es in Leitfähigkeits- und Redoxsensoren genutzt wird) sowie ionisch leitendes pH-Glas (in Form von pH-Glaselektroden) verwendet. Als Lipidschichten kamen Caldarchaeol (CL), mit PLL-PEG modifiziertes Caldarchaeol (CPP) bzw. GDNT zum Einsatz.

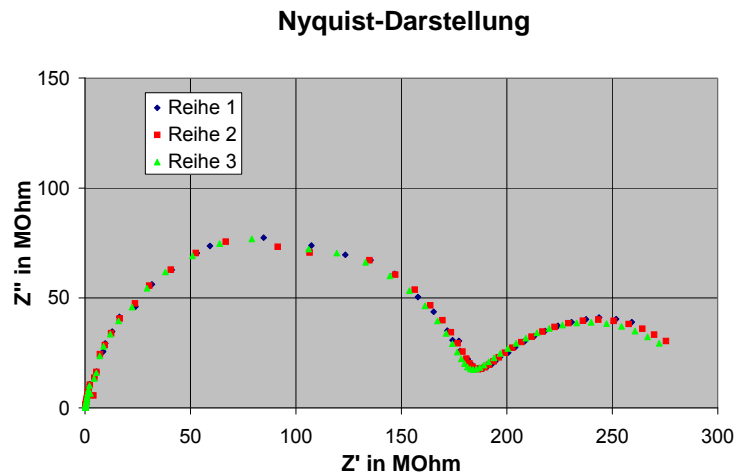


Abb. 10: Impedanz-spektroskopischen Charakterisierung elektrochemischer Sensoren.
 Links: Messanordnung Rechts: Reproduzierbarkeit der komplexen Impedanz einer unbeschichteten pH-Glaselektrode.

Zunächst erfolgte eine Validierung der Reproduzierbarkeit der Methode, die befriedigende Ergebnisse lieferte (s. Abb. 10). Als nächster Schritt erfolgte die Ausgangscharakterisierung der zur Beschichtung vorgesehenen Sensoren/Sensorkomponenten im unbeschichteten Zustand. Nach Durchführung der Lipidierung bei den Partnern MLU (Caldarchaeol und Modifikationen) bzw. iba (GDNT) wurden die jetzt beschichteten Sensoren/Sensorkomponenten erneut mittels EIS charakterisiert.

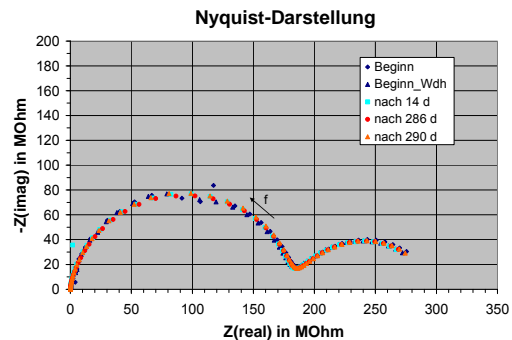
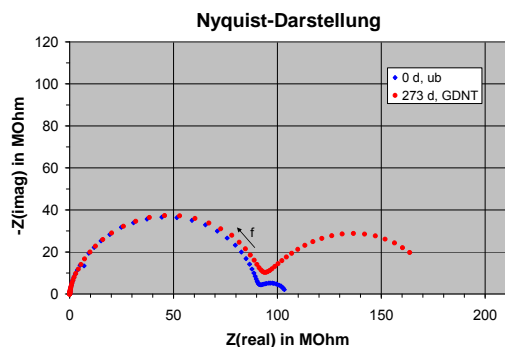


Abb. 11: Komplexe Impedanz
 Links: einer pH-Glaselektrode vor (ub) und nach der Beschichtung mit GDNT (bei unterschiedlichem Alter des pH-Glases).
 Rechts: einer älteren unbeschichteten pH-Glaselektrode zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten.

Bei pH-Elektroden ergab der Vergleich der Messwerte für den unbeschichteten Zustand mit denen der gleichen Exemplare im lipidierten Zustand (zu einem späteren Zeitpunkt) zunächst deutlich sichtbare Unterschiede im niederfrequenten Bereich (s. Abb. 11). Es war allerdings bekannt, dass auch alterungsbedingte Veränderungen an der Glasmembran Änderungen der komplexen Impedanz verursachen können.

Deshalb erschien es sinnvoll, den durch Glasalterung bedingten Einfluss so weit wie möglich zu eliminieren. Hierzu wurden zum einen relativ stark gealterte pH-Gläser verwendet, deren weitere

Alterung erfahrungsgemäß geringer ist und zum anderen versucht, den Alterungseinfluss aus zeitlich versetzten Messreihen an unbeschichteten Exemplaren gleicher Herstellungsladung abzuschätzen.

Aufgenommene Zeitreihen ergaben, dass bei den gut konditionierten Glasmembranen die alterungsbedingten Änderungen der Impedanz im untersuchten Zeitraum (maximal 9 Monate) praktisch innerhalb der Messwertstreuung lagen (s. Abb. 11) und somit unberücksichtigt bleiben können. Alle hier auftretenden deutlichen Veränderungen der Impedanz nach der Lipidierung sollten also direkt (durch die Lipidschicht) oder indirekt (durch das Lipidierungsverfahren) aus dem Beschichteten resultieren.

Bei relativ „jungen“ pH-Gläsern (die denen produzierter pH-Glaselektroden näherungsweise entsprechen) wurde allerdings der bereits früher beobachtete Alterungseinfluss auf das Impedanzspektrum gefunden. Aufgrund des praktisch unvermeidbaren zeitlichen Versatzes zwischen Charakterisierung vor und nach der Beschichtung erscheint damit eine Trennung des Gesamteffektes in einen Alterungs- und einen Beschichtungsanteil erforderlich. Dies wäre jedoch nur mit unangemessen hohem Aufwand möglich.

Bei den untersuchten Pt-Leitfähigkeitsmesszellen lassen sich prinzipiell Unterschiede zwischen dem mit CPP bzw. GDNT beschichteten und dem unbeschichteten Zustand nachweisen. Die Resultate zeigen allerdings auch deutlich, dass hier das Messmedium selbst einen erheblichen Einfluss auf Form und Lage der Messkurven und auf die festzustellenden Unterschiede zwischen dem be- und unbeschichteten Zustand haben kann. Darüber hinaus hängt die Nachweisbarkeit der Beschichtung entscheidend von der geschickten Aufbereitung der Messdaten und der Wahl einer passenden Darstellungsform ab. Die üblichen Darstellungsformen wie Nyquist- oder Bode-Plot scheinen hier nicht ausreichend zu sein.

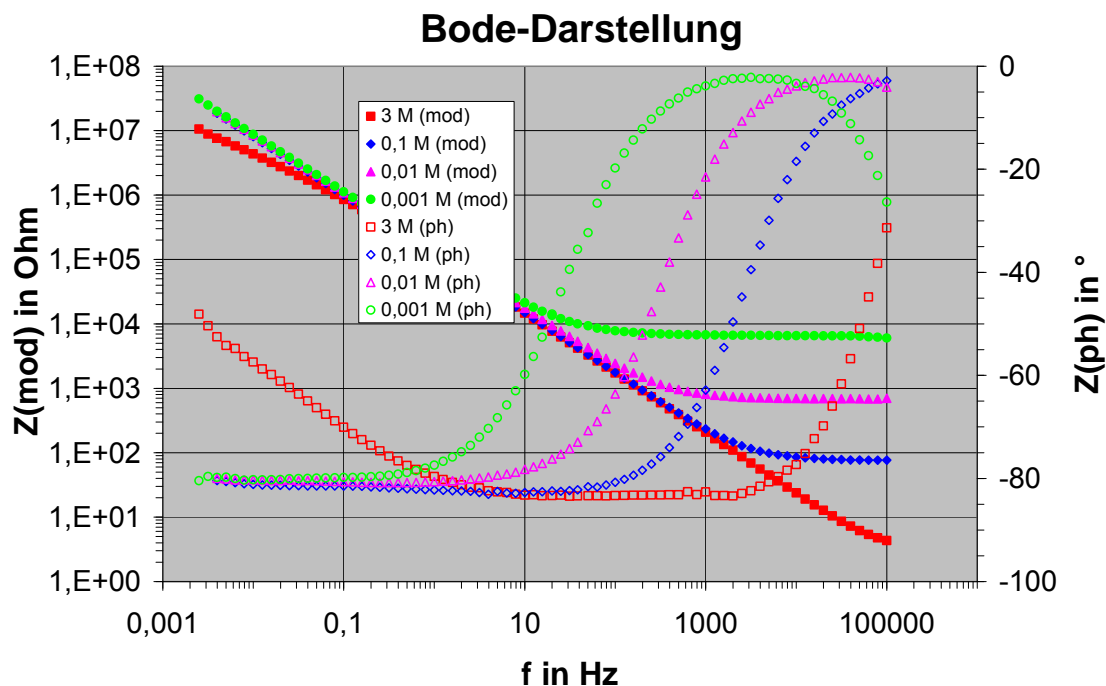


Abb. 12: Impedanzspektrum (mod: Modulus, ph: Phase) einer unbeschichteten Pt-Leitfähigkeitsmesszelle in Abhängigkeit von der KCl-Konzentrationen des Messmediums).

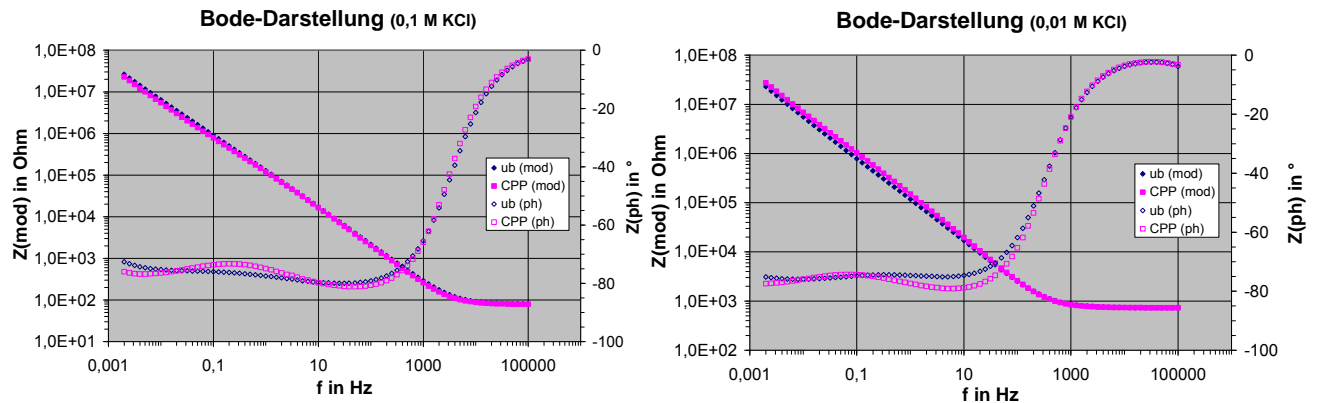


Abb. 13: Impedanzspektren (mod: Modulus, ph: Phase) einer Pt-Leitfähigkeitsmesszelle im unbeschichteten (ub) und beschichteten (CPP) Zustand bei 2 unterschiedlichen KCl-Konzentrationen des Messmediums.

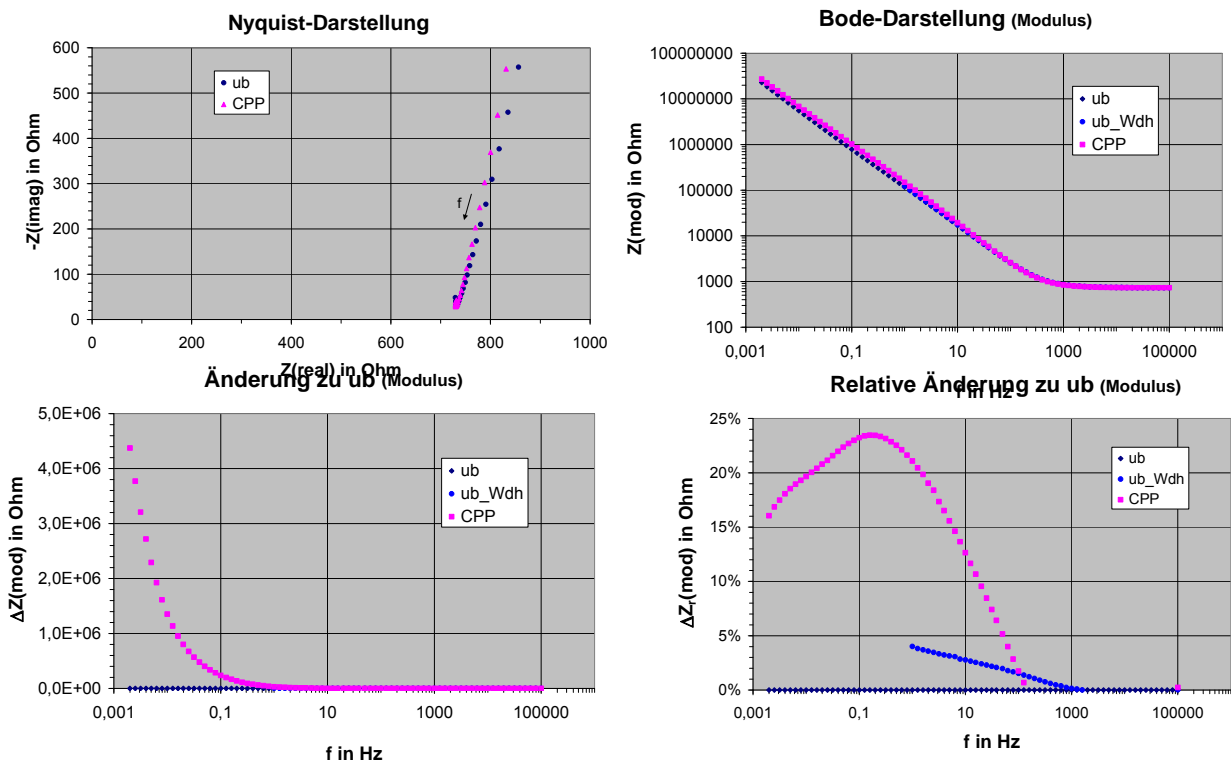


Abb. 14: Einfluss der Darstellungsform der EIS-Messergebnisse auf die Nachweisbarkeit der Unterschiede zwischen dem unbeschichteten (ub) und beschichteten (CPP) Zustand einer Pt-Leitfähigkeitsmesszelle.

Weiterhin wurde geprüft, inwieweit die Dauer des Kontaktes der Schicht mit dem Messmedium die Impedanzspektren verändern kann. Hier zeigten die Untersuchungen, dass bereits nach eintägigem Kontakt Veränderungen zu verzeichnen waren und sich die ursprünglich beobachteten geringen Unterschiede zwischen be- und unbeschichteten Pt-Oberflächen teilweise weiter verringert hatten.

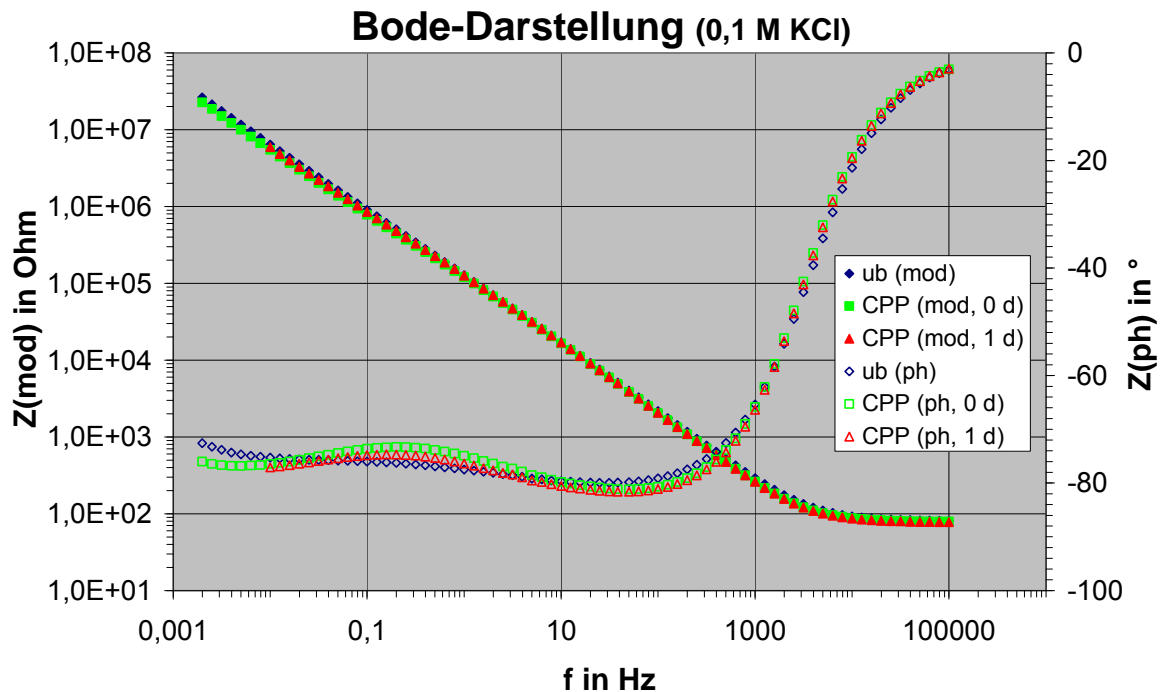


Abb. 15: Impedanzspektren (mod: Modulus, ph: Phase) einer Pt-Leitfähigkeitsmesszelle vor (ub) und nach der Beschichtung (CPP) unmittelbar (0 d) und ca. 1 Tag (1 d) nach dem ersten Kontakt mit dem Messmedium.

iba

Entsprechend der wissenschaftlichen Zielstellung des Projektes, Tetraetherlipid-Schichten zu synthetisieren, die eine sterische Entkopplung der sensorischen Funktionsflächen vom foulingaktiven Medium erlauben, erfolgte die Definition mehrerer Probengruppen. Die Funktionalisierung mit Polyethylenglykol bei variabler Kettenlänge zielt dabei auf die Wirkung spezifischer Polymerkonformationen zur Etablierung von effektiven Elektronendonator- und -akzeptorpositionen und damit auf eine maximale Affinität gegenüber Wassermolekülen ab. Vor diesem Hintergrund dienen Spacermoleküle wie z.B. die Boronsäure der Verstärkung des Hydratationseffektes. Es ergaben sich folgende Probengruppen:

Tab. 5: Probenplanung im Projektzeitraum

Modifizierung 1: PEG - Kettenlängen		Modifizierung 2: alternative Funktionsmoleküle	
Probengruppe 1 <i>PEG direkt an TL</i>	TL PEG 1000 TL PEG 3500 TL PEG 8000	Probengruppe 2, 3, 6 <i>Funktionsmoleküle direkt an das Lipid gebunden</i>	TL Hydroxyectoin TL Mannose TL Hyaluronsäure TL Chitosan
Probengruppe 5 <i>PEG an PLL</i>	TL PLL PEG 750 TL PLL PEG 3000 TL PLL PEG 5000	Probengruppe 4 <i>Funktionsmoleküle über Boronsäure als Spacer gebunden</i>	TL B Inulin TL B Trehalose TL B Chitosan
Probengruppe 5 <i>PEG an PLL in unterschiedlichen Konzentrationen</i>	TL PLL PEG 20% TL PLL PEG 30% TL PLL PEG 40%		

Zielstellung der Detektion unspezifischer Wechselwirkungen an funktionalisierten Tetraetherlipid-schichten ist es, die Basis einer experimentellen Verifizierung für die parallel zu realisierenden numerischen Simulation zu bilden. Die gängigste Methode dieser Messungen ist die kolloidale Kraftspektroskopie. Im Vorhaben erfolgte dementsprechend an den unmodifizierten Substraten und den Oberflächen der verschiedenen Probengruppen die Aufnahme von Kraft-Abstandskurven in destilliertem Wasser unter folgenden Messbedingungen:

- goldbeschichteter, spitzenloser Dreieckscantilever (Veeco), Empfindlichkeit von 0,11 V/nm
- Quarzglas-Kugel mit Durchmesser 10 µm

Messungen auf der unbehandelten Glasoberfläche (B33) verdeutlichen einen Adhäsionseffekt im Vergleich zur lipidierten Oberfläche, auf welcher erstmals eine Potenzialschwelle als Maß für eine Abstoßungskraft detektiert wurde. Die nachträgliche Funktionalisierung des Lipids mit Chitosan oder PEG führt zu einer weiteren repulsiven Wirkung, welche sich im Vergleich in der geringsten Abrisskraft und Haftenergie (Fläche unter der Rückzugskurve) widerspiegeln (s. Abb. 16).

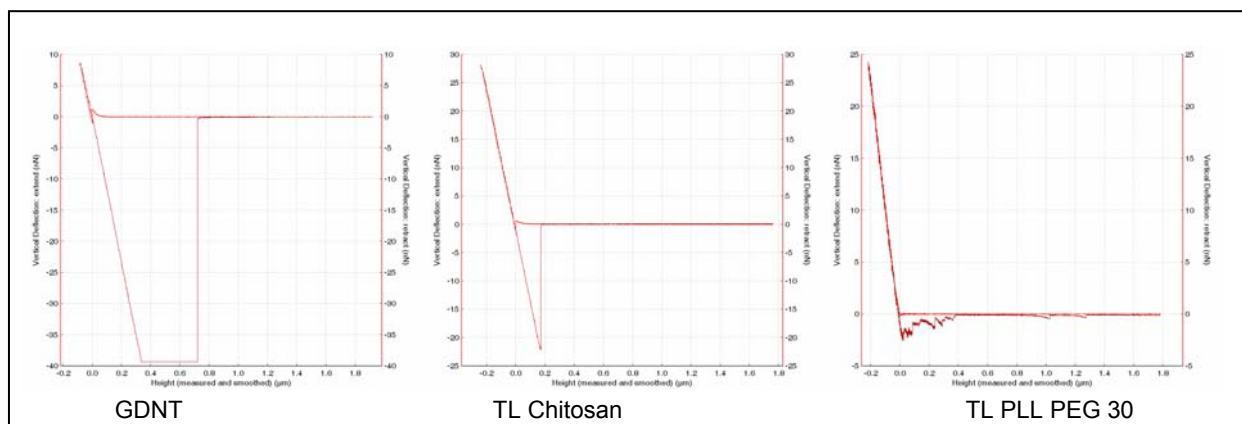
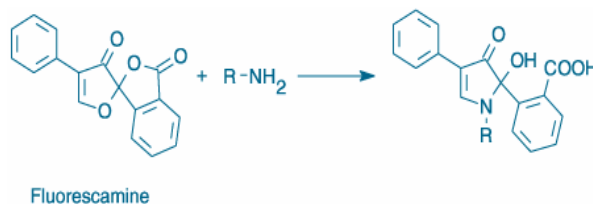


Abb. 16: Repräsentative Kraft-Abstands-Funktionen, dest. Wasser, Quarzkugel 10 µm

MLU

Der Nachweis der erfolgreichen Lipidierung und nachfolgenden Modifizierung erfolgt hauptsächlich durch die Bestimmung der Kontaktwinkel sowie durch ellipsometrische Schichtdickenbestimmung „mitbeschichteter“ Si-Wafer. Wenn es möglich war, erfolgte ein Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie oder am LSM.

Der Fluoreszenzfarbstoff Fluram (Fluorescamine, s. untere Abb.) fluoresziert erst nach der Reaktion mit Aminogruppen und ermöglicht so einen effizienten Nachweis dünner Oberflächenfilme aus Aminosilan, Polylysin, Bis-Amino-PEG oder Dopamin, da unspezifische Untergrundfluoreszenzen weitgehend ausgeschlossen sind.



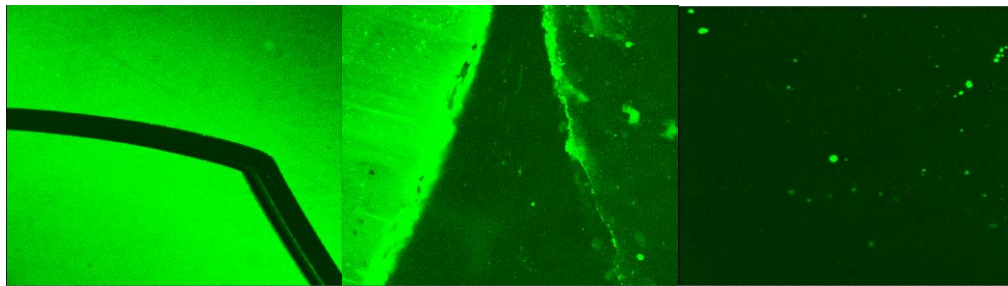


Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopie an silanisierten Ronden
A: Ronde mit Aminosilan (Kratzer mit Pinzette)
B: Direkter Vergleich Ronde mit (links) und ohne Aminosilan (rechts)
C: Kontrolle (nichtsilanisierte Ronde)

Auf Grund der starken Eigenfluoreszenz der Si-Wafer funktioniert das Verfahren nur mit Glas. Für die optimale Ergebnisbeurteilung müssen folglich ellipsometrische Schichtdickenmessungen an Si-Wafer mit dem Nachweis der Bindung von chemischen Gruppen mittels Fluoreszenztest an Glasoberflächen kombiniert werden. Aus diesem Grunde wurden während des gesamten Projektes stets Si-Wafer gemeinsam mit den für die Testung bei unseren Projektpartnern vorgesehenen Glasproben „mitbeschichtet“.

Der Nachweis von Lipidschichten auf Trägermaterialien durch Fluoreszenzfärbung mittels Texasred und die Unterscheidung von der gering fluoreszierenden Unterlage gelingt wie folgt: Eine lipidierte Probe wird mit einem Kupfergrid (Durchmesser 3 mm) belegt und mit UV-Licht (Xeradex) bestrahlt, dabei bleibt nur das Lipid unter den Stegen des Grids erhalten und kann mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbt werden. In der nachfolgenden Abbildung ist links der Kupfergrid dargestellt sowie das Ergebnis der Texasredfärbung nach der Bestrahlung. Die helleren Partien mit Lipid heben sich vom weniger fluoreszierenden Untergrund ab.

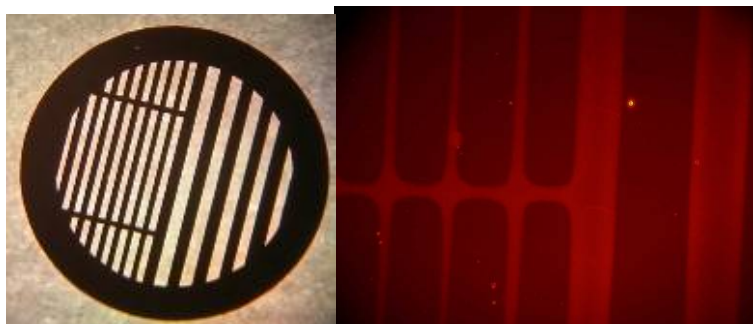


Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopie Axiovert, Objektiv 20x, 25 sek belichtet
Links: Struktur des Grids
Rechts: Mit TEL behandelte Ronde nach Bestrahlung und Färben mit Texasred

Mittels Ellipsometrie kann dieses Ergebnis durch die Bestimmung der Schichtdicken bestätigt werden. Die folgende Abbildung zeigt einen lipidierten Wafer nach der UV-Bestrahlung mit aufgelegtem Grid (vermessene Fläche: 5x6 mm). Auf der Siliziumdioxidschicht (etwa 2 nm) sind die Reste der Lipidschicht von ca. 2 nm Dicke in der Größe des Grids nachzuweisen: Der Rand des Grids ist eindeutig zu erkennen.

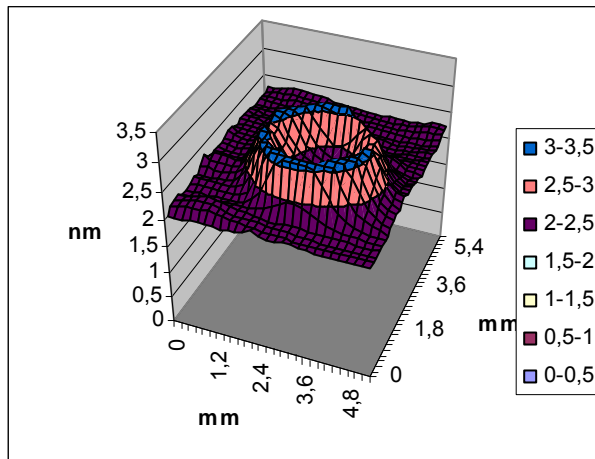


Abb. 19: Ellipsometrie eines beschichteten Wafers nach UV-Bestrahlung mit aufgelegtem Grid

6.3.2 Physikochemische Charakterisierung

iba

Die Bestimmung des Mobilitätsfaktors gestattet die Beurteilung der Heterogenität und Flexibilität sterisch modifizierter Schichten. Die in Abb. 20 präsentierten Ergebnisse weisen auf die zunehmende Flexibilität infolge der PEG-Anbindung hin (Anstieg des Mobilitätsfaktors) kombiniert mit einem geringerem Wasserkontaktwinkel. Dagegen zeigen die mit kleinen Molekülen ausgestatteten Proben geringere Werte bzw. unflexiblere Schichten mit gesteigerter Hydrophobizität. Allein die Probe TL Chitosan erreicht Ergebnisse, welche mit der PEG-Schicht vergleichbar sind.

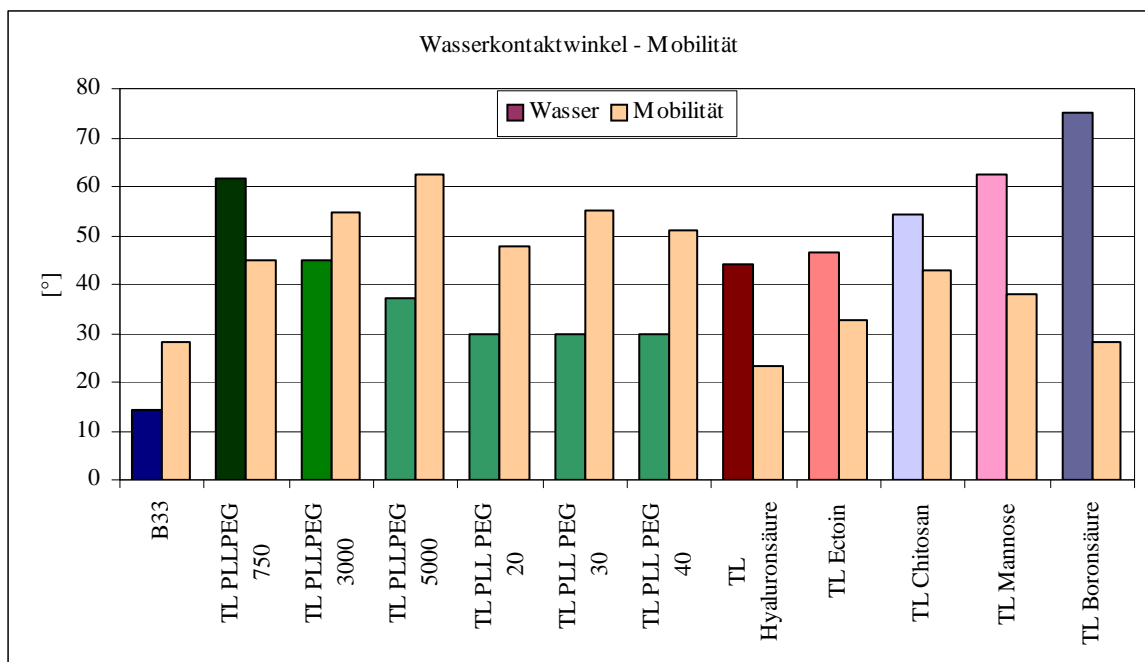


Abb. 20: Wasserkontaktwinkel und Mobilitätsfaktor der modifizierten Lipidschichten

Treten zwei Oberflächen, umgeben von wässrigen Medien, in einen geringen Abstand zueinander, so wird die Grenzflächenenergie zusätzlich von Hydratationseffekten bestimmt. Ihr Ursprung liegt in der Wasserstruktur, gegeben durch den Polarisierungseffekt des Wassermoleküls. Hydratationseffekte, die nicht primär elektrostatisch interpretierbar sind, basieren auf der Vernetzung von Wassermolekülen. Hier spricht man von Protonen- bzw. von Säure-Base-Wechselwirkungen [van Oss, C., J. Mol. Recognition, 2003, p. 177-190]. Zusammengefasst können diese Effekte in der Oberflächenspannung und deren dispersiven und polaren Anteilen dargestellt werden.

Im Ergebnis führt die Kopplung des Polyethylenglykols an das Lipid zu einer Zunahme der Oberflächenpolarität bei vergleichbarem dispersiven Anteil. Allein die Kopplung der Mannose und der Boronsäure zeigt geringere Oberflächenspannungen aufgrund der geringeren polaren Anteile. Analysiert man den Parameter Polarität bezogen auf die Gesamtoberflächenspannung, so zeigt sich, dass die Modifikationen mit Chitosan und PLL PEG 5000 die höchsten Werte um 47% erreichen.

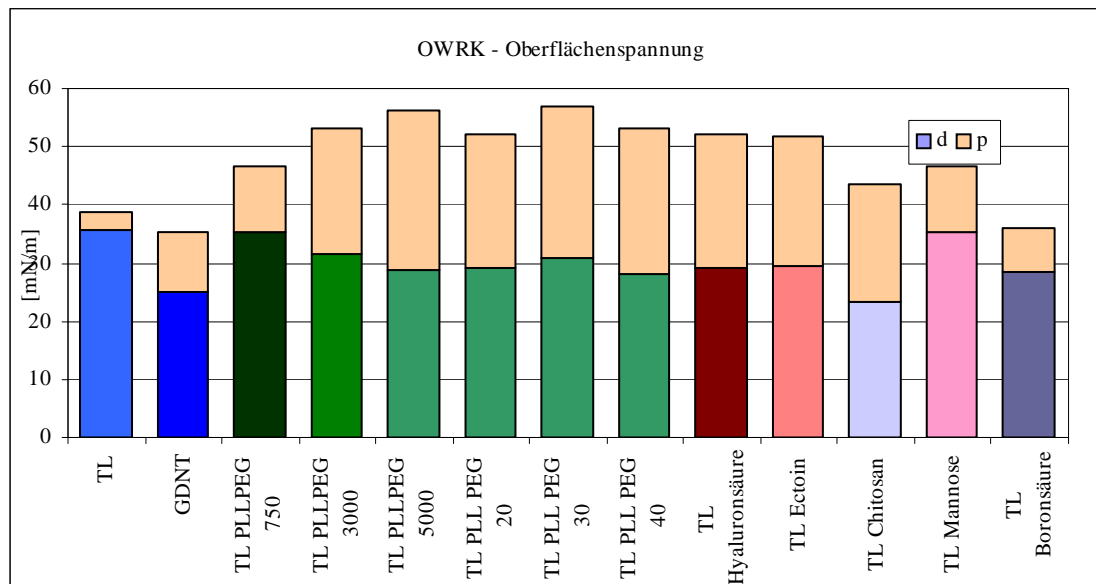


Abb. 21: Oberflächenenergien, polare- und disperseive Anteile der modifizierten Lipidschichten

Zusätzlich wurden mit Hilfe der Strömungspotenzialmethode die elektrokinetischen Potenziale an den funktionalisierten Oberflächen ermittelt. Erwartungsgemäß führt die Ankopplung des Polylysin (PLL) aufgrund der freien Aminogruppen zu positiveren Oberflächenladungen bzw. zur Nivellierung des negativen Potenzials. Dieser Effekt wird bei vollständigerer Kopplung des PEG reduziert. Die Kopplung der Funktionsmoleküle führt zumeist ebenfalls zu negativen Oberflächen mit Ausnahme der Probe TL Chitosan, welche ein geringeres bzw. positiveres Potenzial aufweist.

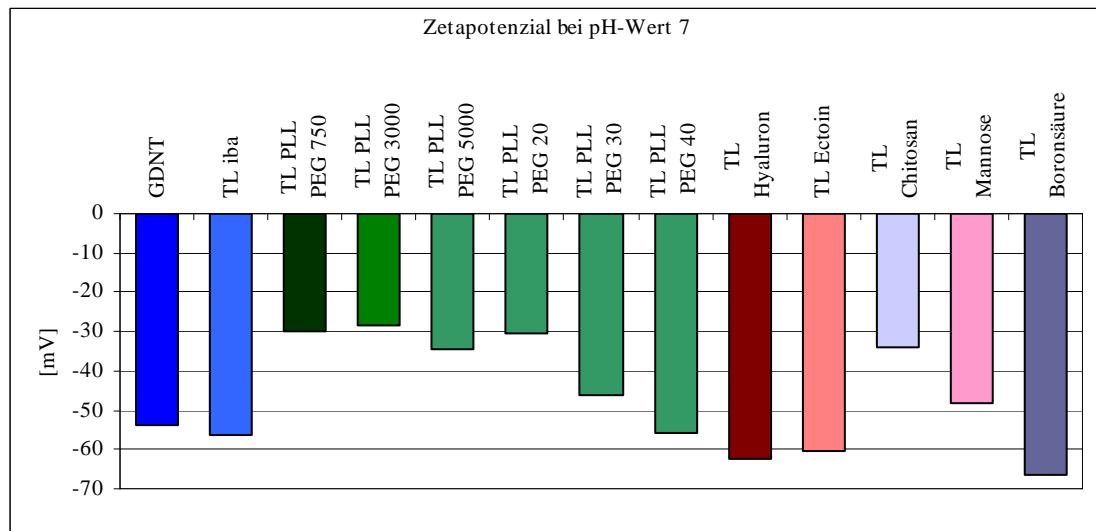


Abb. 22: Elektrokinetische Potenziale der modifizierten Lipidschichten

In der Zusammenfassung der physikochemischen Charakterisierung kristallisieren sich zwei Schichtsysteme aufgrund ihrer Oberflächenparameter heraus: das Polyethylenglykol 5000 gebunden über PLL als Spacer und die Modifikation TL Chitosan. Sie zeigen eine hohe Mobilität der Schicht, einen relativ hohen polaren Charakter bei geringen Zetapotenzialen. Die geringen Abriss- bzw. Haftkräfte, ermittelt mit Hilfe der kolloidalen Kraftspektroskopie, bestätigen die besonderen Eigenschaften dieser Schichtsysteme aus oberflächenanalytischer Sicht.

6.3.3 Topografische Charakterisierung

iba

Die Rasterkraftmikroskopie diente der Bewertung der Homogenität der Tetraetherlipidschicht. Zudem wurde dieses Verfahren zur Analyse der Oberflächenstruktur nach der Funktionalisierung der Lipide eingesetzt. Hier kam das Nanowizard-Messsystem der Fa. jpk-instruments Berlin zur Anwendung (Tapping-Mode unter Luft). Es wurden Detailaufnahmen ausgewertet, welche einen Bildausschnitt von $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ wiedergeben. Der Rautiefenparameter bezieht sich dabei auf die gescannte Fläche. Insgesamt wird die mögliche Beschichtung im nanoskaligen Maßstab verdeutlicht. Sowohl die Lipidierung als auch die nachträgliche Funktionalisierung z.B. mit Polyethylenglykol führen zu keiner drastischen Zunahme der Rautiefe.

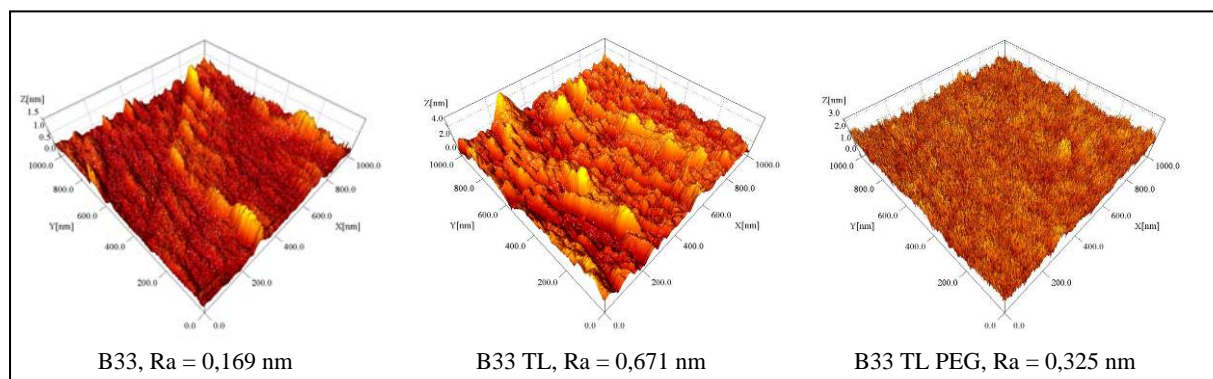


Abb. 23: AFM-Topografie-Aufnahmen lipidierter Glassubstrate

MLU

Es wurde ein Versuch unternommen, die molekulare Struktur der oberflächlich fixierten Lipidschichten aufzuklären. Dazu wurden auf Si-Wafern Selfassembly-Schichten aus wässrig/ organischer Lösung und rein organischer Lösung erzeugt und an identischen Proben zuerst ellipsometrisch die Schichtdicke bestimmt und danach mittels AFM die Homogenität der Schichten untersucht.

Während sich auf dem Wafer bereits nach kurzer Zeit relativ homogene ca. 4 nm dicke Tetraetherlipid-Schichten aus organischer Lösung abscheiden, zeigte sich im Falle des wässrig/ organischen Verfahrens, dass die beim Dispergieren entstandenen kugeligen Molekülaggregate (Mizellen?) von ca. 30 nm Durchmesser erhalten bleiben und in dieser Form auf der Oberfläche erstaunlich fest adsorbieren (und nicht etwa breit laufen).

Mit Ultraschall lassen sie sich jedoch entfernen. Der Lipidfilm lässt sich mit der AFM-Spitze von der Oberfläche zur Seite kratzen, was als zusätzlicher Beweis für die Präsenz einer Lipidschicht gilt.

Die Abb. 24 vergleicht SAM-Schichten aus organischer und wässriger Lösung. Nach Ultraschallbehandlung zeigt sich in beiden Fällen eine homogene und nahezu defektfreie monomolekulare Lipidbeschichtung. Im Gegensatz dazu sieht man, dass auf einer Filmwaage präorganisierte TEL-Filme aus ineinander verzahnten Domänen mit vielen Zwischenräumen bestehen.

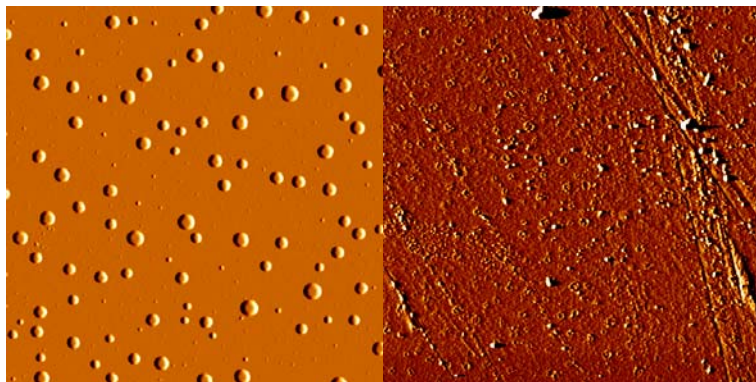


Abb. 24: Self-Assembly (wässrig/ org.), a) vor und b) nach 10min Ultraschallbehandlung

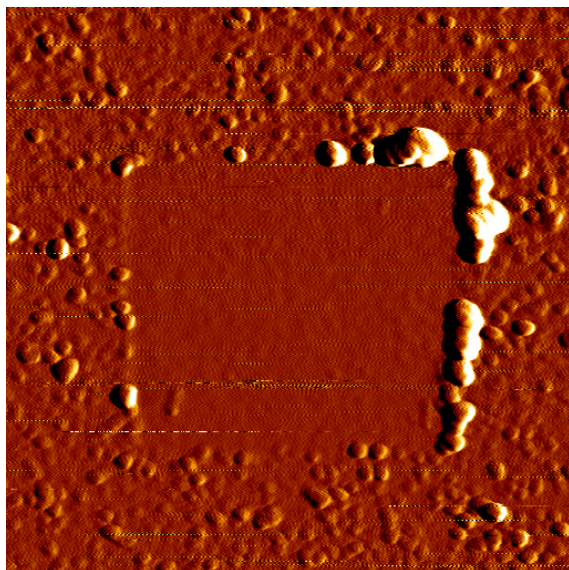


Abb. 25: Self assembly aus org. Lsg.: In der Mitte wurde mit der AFM-Spitze das Lipid zur Seite gekratzt.

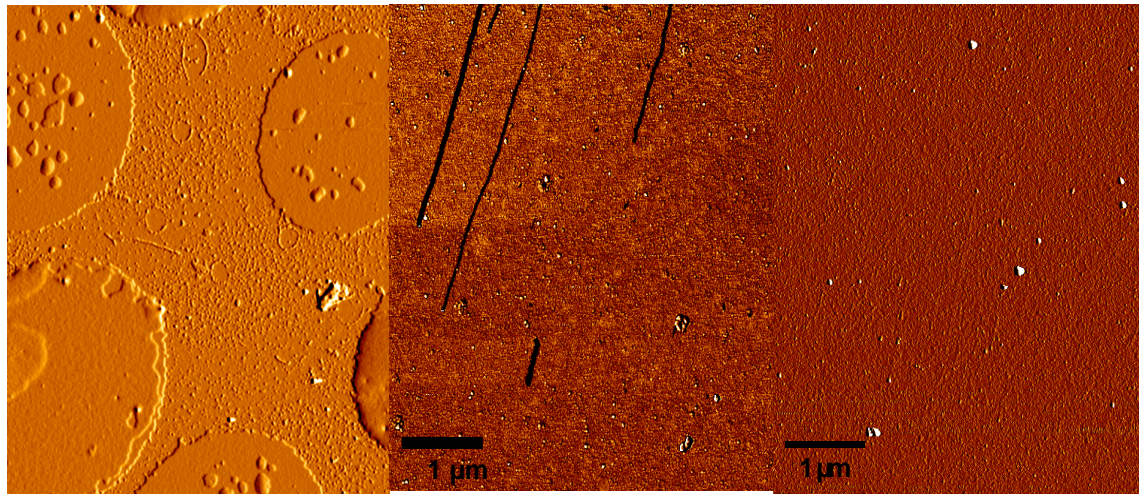


Abb. 26: Vergleich SAM-Schichten aus organischer und wässriger Lösung
 Links: LB-Film Mitte: SAM-Film, organ. Lsgm. Rechts: SAM-Film wässriges Lsgm.

6.3.4 Charakterisierung der Sensorfunktionalität

4HJE

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes erfolgte die Untersuchung des Einflusses der modifizierten Tetraetherlipidschichten auf die Eigenschaften sensorischer und funktionaler Komponenten von Durchflussmessstrecken sowie der Nachweis der Beständigkeit der Schichten unter applikationsspezifischen Bedingungen, die im Labor simuliert wurden.

Untersuchungsgegenstände:

- Benetzbarkeit
- UV-Beständigkeit
- Temperaturbeständigkeit
- Beständigkeit gegen Scherkräfte (strömendes Messmedium)
- Beständigkeit gegen abrasiv wirkende Partikel
- Beständigkeit gegen verdünnte Säure

Tab. 6: Ergebnisse der Tests zur Benetzbarkeit beschichteter Oberflächen

Schicht	Verhalten
- (B33)	Referenz
TL GDNT OH	wie unbeschichtetes B33
TL (diakt. Caldarchaeol)	schlechter benetzbar
TL PLL PEG	besser benetzbar
TL Boronsäure	schlechter benetzbar
TL Mannose	besser benetzbar
TL Chitosan	besser benetzbar
TL PO ₄	schlechter benetzbar

Während eine Beschichtung mit TL GDNT OH keinen Einfluss auf die Benetzbarkeit der Substratoberfläche im Vergleich zur unbeschichteten Probe hat, führen Beschichtungen mit diaktiviertem Caldarchaeol, TL Boronsäure und TL PO₄ zu einer etwas schlechteren Benetzbarkeit. Für TL PLL PEG, TL Mannose und TL Chitosan ist hingegen eine leichte Verbesserung nachzuweisen. Ob sich daraus Konsequenzen für den praktischen Einsatz der Schichten ergeben, ist aus den Untersuchungen zur Biofunktionalität und mit dem Demonstrationssystem abzuleiten.

Zur Untersuchung der UV-Beständigkeit wurde folgender Testaufbau realisiert:

- je Schichttyp 2 Parallelen und eine Referenz (Trägermaterial Borofloat® B33)
- UV-Exposition: UV-Lampe 254 nm (UV-C), 10 cm Abstand zu den Proben
- Strahlungsintensität 800 µW/cm²
- Exposition: täglich 4 x 1 Stunde, dazwischen 1 Stunde reine Tageslichtexposition
- Expositionsdauer: 2 Monate bzw. 1 Monat (TL Chitosan und TL PO₄)

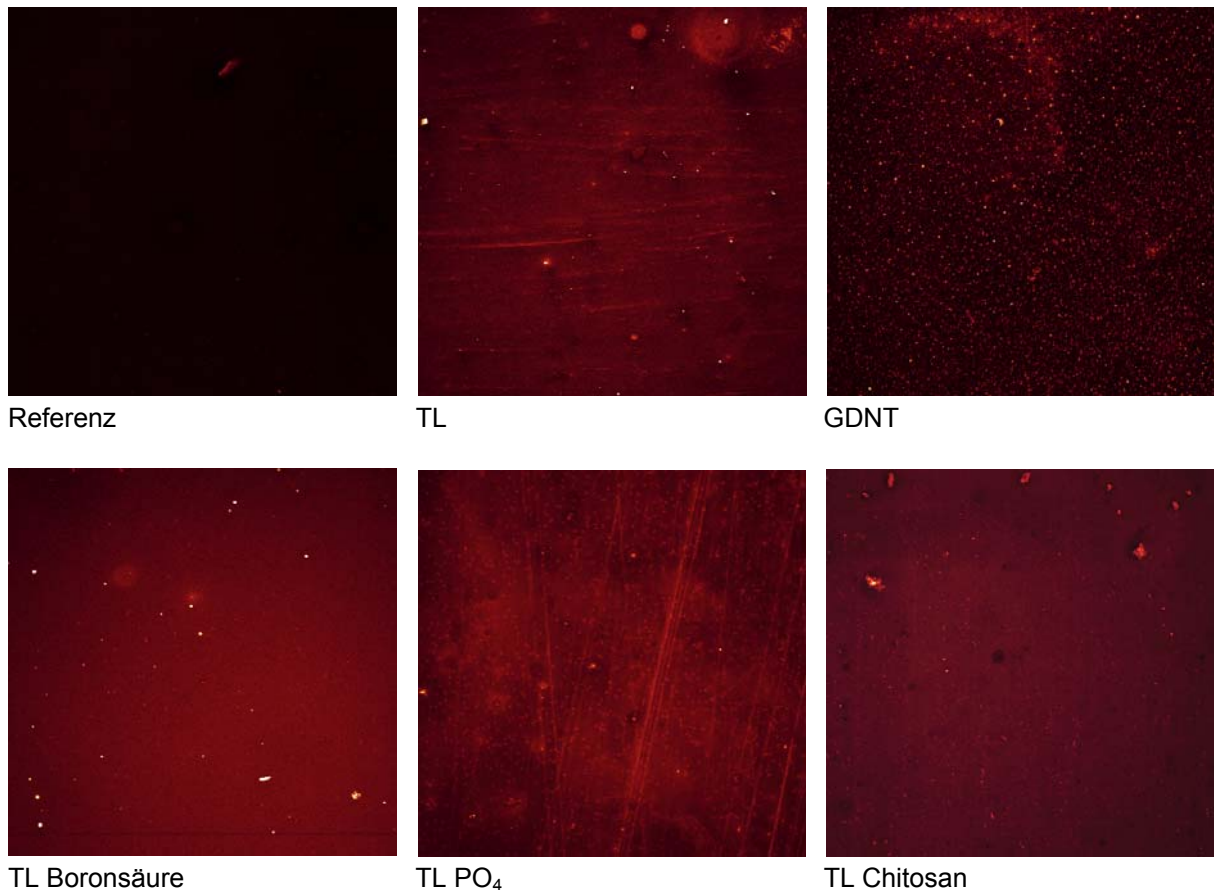


Abb. 27: UV-Beständigkeit, beispielhafte CLSM-Aufnahmen nach DiO-Färbung (durchgeführt bei Partner iba)

Alle untersuchten TL-Modifikationen sind nach der UV-Exposition ohne Beschädigungen nachweisbar und damit als stabil einzuschätzen.

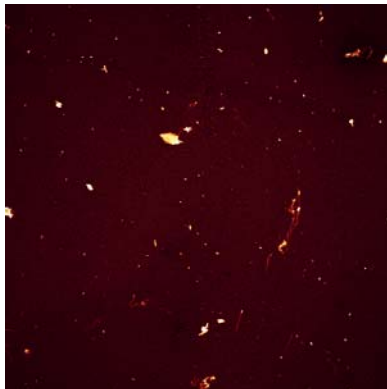
Für die Ermittlung der Temperaturbeständigkeit wurden die Schichtsysteme einer wechselnden thermischen Beanspruchung unterzogen.

- je Schichttyp 2 Parallelen (Trägermaterial Borofloat® B33)
- Exposition im Kryostaten, Eintauchtiefe 20 cm
- zyklischer Temperaturwechsel zwischen 2°C und 38°C, Verweilzeit je 1,5 h

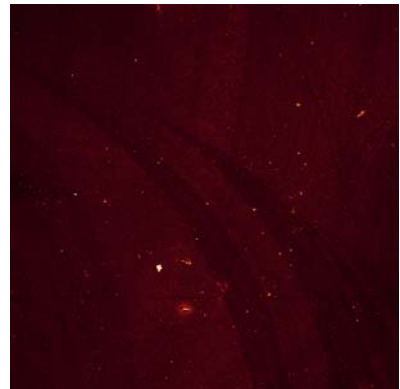
- Exposition kumulativ: 45 h pro Temperatur
- 50 Temperaturwechsel



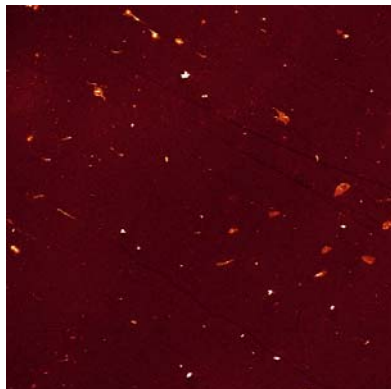
Referenz



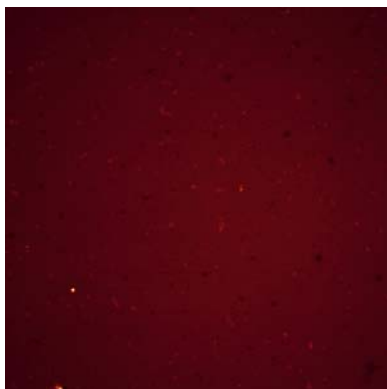
TL



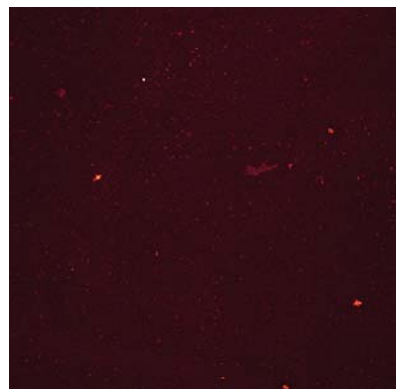
GDNT



TL Boronsäure



TL PO₄



TL Chitosan

Abb. 28: Temperaturbeständigkeit, beispielhafte CLSM-Aufnahmen nach DiO-Färbung (durchgeführt bei Partner iba)

Alle untersuchten TL-Modifikationen sind nach der thermischen Beanspruchung ohne Beschädigungen nachweisbar und damit beständig gegen Temperaturschwankungen.

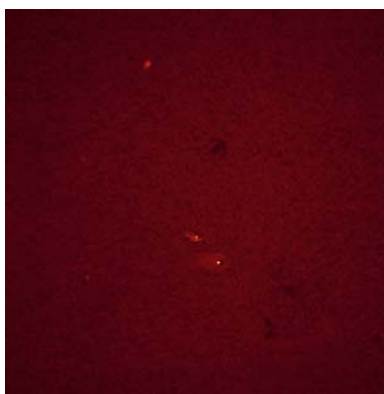
Die Untersuchungen zur Beständigkeit gegen Scherkräfte erfolgten im strömenden Medium.

- je Schichttyp 2 Parallelen (Trägermaterial Borofloat® B33)
- Medium: deionisiertes Wasser
- Test mit Magnetrührer, Strömungsgeschwindigkeit ca. 2 m/s
- Expositionsdauer: 80 h

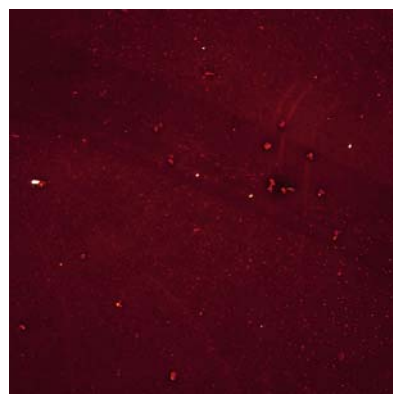
Alle untersuchten TL-Modifikationen sind nach der Scherkraft-Beanspruchung ohne Beschädigungen nachweisbar und dementsprechend für einen Einsatz im strömenden und turbulenten Messmedium geeignet.



Referenz



TL PO₄



TL Chitosan

Abb. 29: Strömungsbeständigkeit, beispielhafte CLSM-Aufnahmen nach DiO-Färbung (durchgeführt bei Partner iba)

Die Testreihen zur Untersuchung der Beständigkeit gegen abrasiv wirkende Partikel wurden wie folgt durchgeführt:

- je Schichttyp 2 Parallelen und eine Referenz (Trägermaterial Borofloat® B33)
- partikelhaltige Testlösung: 150 mg/l, Partikel aus Aluminiumoxid und Siliziumcarbid in deionisiertem Wasser
- Partikelgrößenverteilung:

Ø 320 µm	0,4%
Ø 120 µm	41%
Ø 20 µm	32%
Ø 9 µm	27%
- Test: Magnetrührer, Geschwindigkeit ca. 2 m/s, 48 h (6 x 8 h).

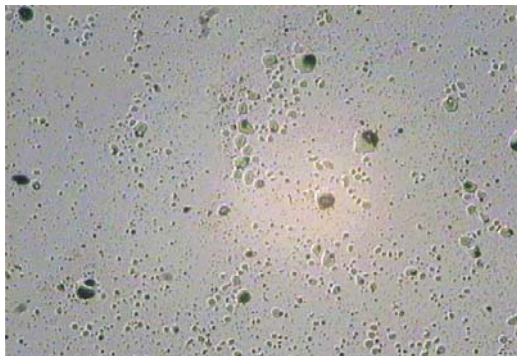
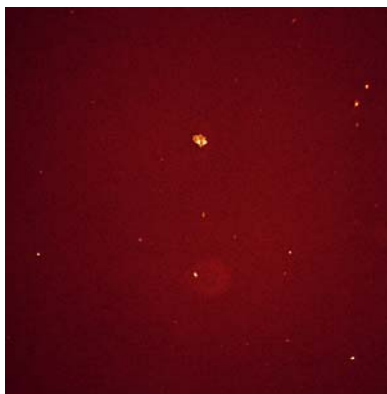


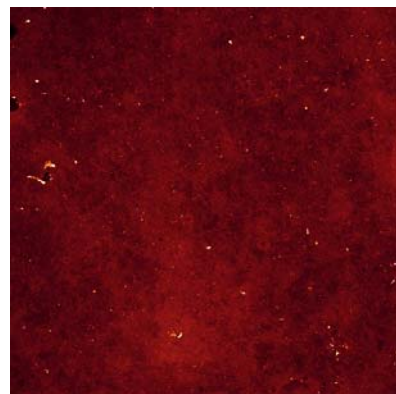
Abb. 30: Mikroskopaufnahme der partikelhaltigen Testlösung



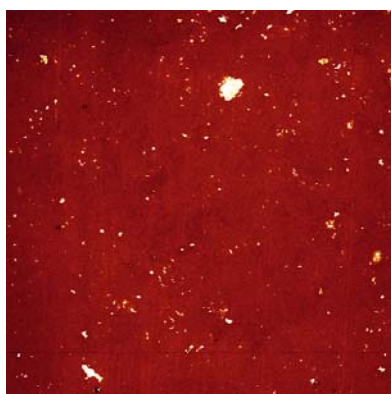
Referenz



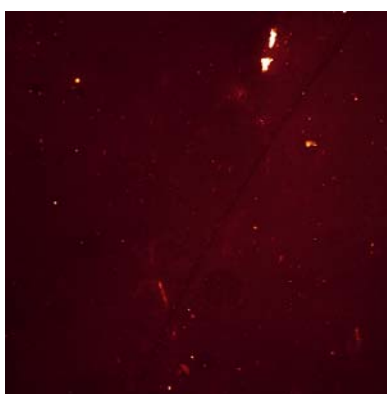
TL



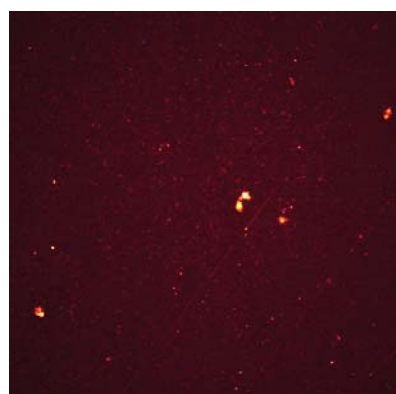
GDNT



TL Boronsäure



TL PO₄



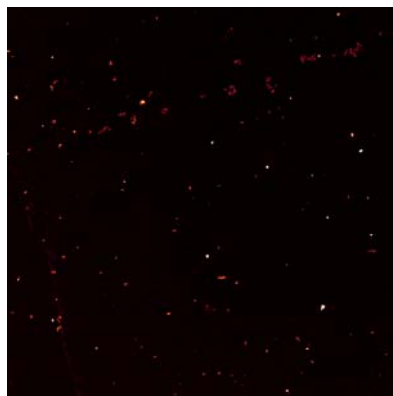
TL Chitosan

Abb. 31: Abrasionsbeständigkeit, beispielhafte CLSM-Aufnahmen nach DiO-Färbung (durchgeführt bei Partner iba)

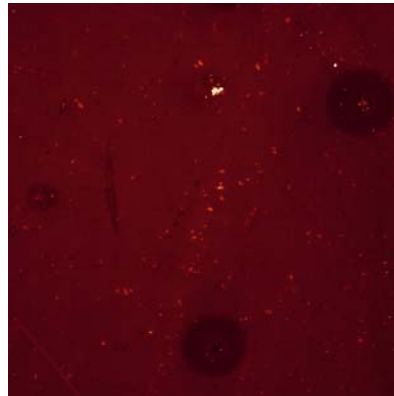
Die Erprobung der Antifoulingsschichten unter simulierten Bedingungen mit Relevanz für *in situ*-Gewässermesstechnik zeigte, dass die Stabilität der dünnen, kovalent gebundenen Tetraetherlipid-Schichten im Vergleich zu anderen bisher untersuchten Antifouling-Schichten als ausgesprochen zufrieden stellend einzuschätzen ist. Auch nach den Testreihen zur Abrasionsbeständigkeit waren alle untersuchten Schichten nachweisbar und im Auswertebereich waren keine Beschädigungen zu verzeichnen.

In der vorgesehenen Applikation der Durchflussmessstrecken sollte das Antifoulingkonzept auf Tetraetherlipidbasis mit anderen bewuchsverhindernden Maßnahmen, wie einer zyklischen Spülung mit Frischwasser und verdünnter Säure, kombiniert werden. Entsprechende Testreihen zur Untersuchung der Säurebeständigkeit der Lipidschichten wurden durchgeführt.

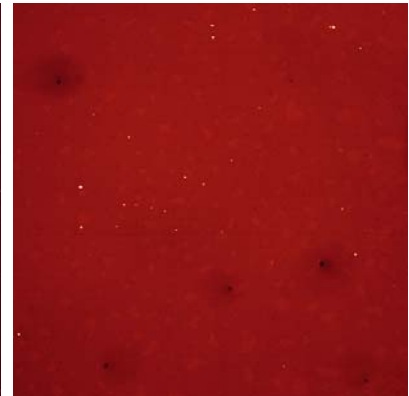
- je Schichttyp 2 Parallelen und eine Referenz (Trägermaterial Borofloat® B33)
- Testlösung: Schwefelsäure in deionisiertem Wasser
- Endkonzentration 0,05%
- pH-Wert 1,67 bei 21,2°C
- Exposition: flach in einer Glasschale auf dem Kreisschüttler
- Expositionsdauer: 24 h



Referenz



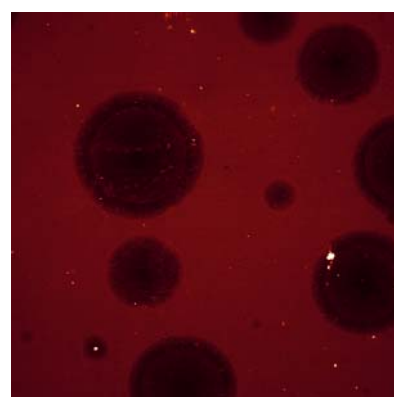
TL



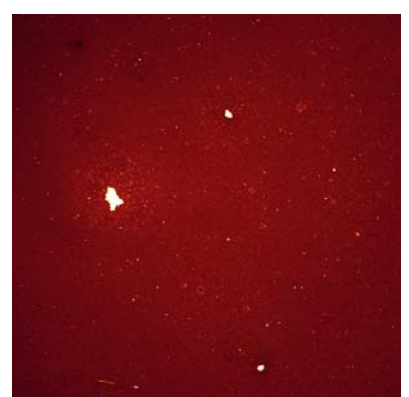
GDNT



TL Boronsäure



TL PO₄



TL Chitosan

Abb. 32: Säurebeständigkeit, beispielhafte CLSM-Aufnahmen nach DiO-Färbung (durchgeführt bei Partner iba)

Beide Tetraetherlipide (GDNT und TL) und alle TL-Modifikationen weisen nach der Säureexposition mehr oder weniger ausgeprägte kreisrunde Läsionen auf. Am deutlichsten sind die Beschädigungen der Schicht bei TL PO₄ zu sehen. Am stabilsten hat sich TL Chitosan erwiesen.

Da in der Applikation Durchflussmessstrecke keine Dauerspülung mit verdünnter Säure erfolgt, sondern je nach Bedarf ein- bis zweimal täglich für 5 Minuten mit Säure gespült wird, wurde dieser Test unter entsprechend geänderten Versuchsbedingungen mit den verbliebenen Proben wiederholt.

- Testlösung: Schwefelsäure in deionisiertem Wasser
- Endkonzentration 0,05%
- pH-Wert 1,67 bei 21,2°C
- Exposition: in Petrischalen auf dem Kreisschüttler
- Expositionsdauer: zweimal täglich 5 Minuten Säure, dazwischen und über Wochenende Reinstwasser, geplante Gesamtdauer knapp 7 Monate = 24 h Gesamtexpositionszeit Säure

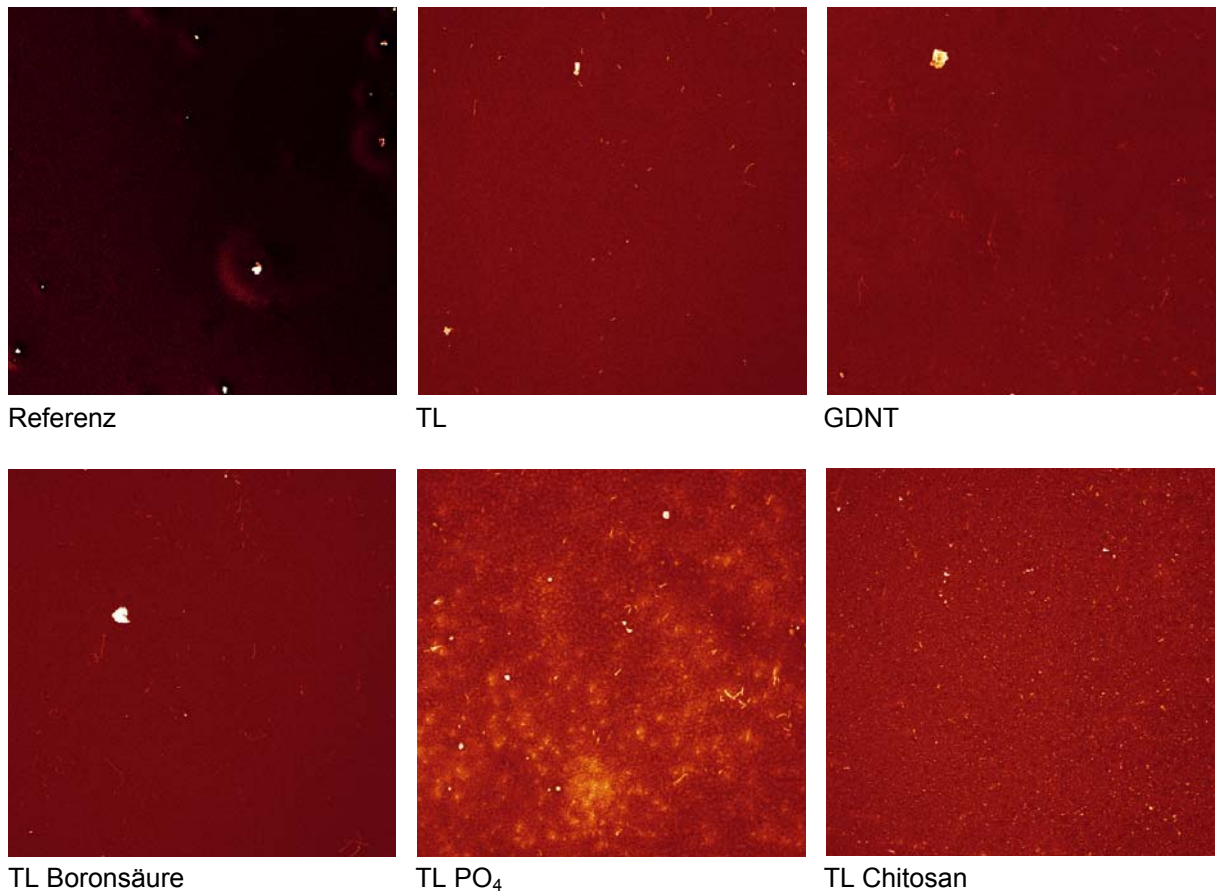


Abb. 33: Säurebeständigkeit, beispielhafte CLSM-Aufnahmen nach DiO-Färbung (durchgeführt bei Partner iba)

Alle untersuchten TL-Modifikationen sind nach dem zyklischen Spülen mit verdünnter Schwefelsäure ohne Beschädigungen nachweisbar. Die Schichten TL PLL PEG und TL PO₄ sind etwas inhomogener, aber ohne Zerstörungen. Eine Kombination des Antifoulingkonzeptes auf Tetraetherlipid-Basis mit einer Säurespülung kann demnach realisiert werden.

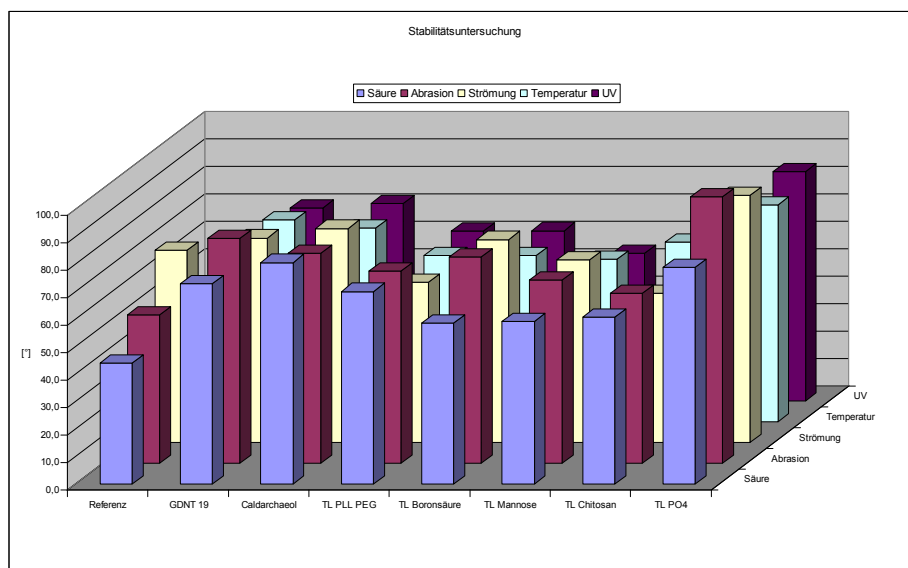


Abb. 34: Kontaktwinkel nach den Stabilitätstests (Messung durchgeführt bei Partner iba)

STM

Bei der Entwicklung geeigneter Antifoulingsschichten für elektrochemische Sensoren war insbesondere zu berücksichtigen, dass die Beschichtung nicht nur die Biofilmbildung verringern, sondern auch die elektrochemischen Eigenschaften der sensorischen Funktionsflächen möglichst wenig verändern sollte. Um dies sicher zu stellen, wurden für jeden Sensortyp spezielle zu überprüfende Sensorparameter ausgewählt. Zur Berücksichtigung der herstellungsbedingten Unterschiede zwischen einzelnen Sensorexemplaren wurde die Sensorfunktionalität dabei so ermittelt, dass jedes unter AP 6.2 aufgebaute Funktionsmuster nicht nur nach, sondern auch vor der Beschichtung charakterisiert wurde. Diese Anfangscharakterisierung erlaubte somit generell spätere Vergleiche mit lipidisierten Zuständen. Im Falle wirksamer Materialalterungsprozesse (s.a. Pkt. 6.3.1) musste der Vergleich möglichst zeitnah erfolgen.

pH-Messelektroden

Die Charakterisierung der Funktionalität von pH-Messelektroden erfolgte anhand der Parameter der sogenannten „Elektrodenfunktion“ (Steilheit, Kettennullpunkt und Linearität der Kalibriergeraden). Die Charakterisierung von mit unmodifiziertem Caldarchaeol beschichteten pH-Glaselektroden ergab eine uneingeschränkte Funktionsfähigkeit der Muster. Die gegenüber den unbeschichteten Exemplaren um 0,1...0,2 pH-Einheiten leicht erhöhten Werte des Kettennullpunktes sind wahrscheinlich eine Folge der natürlichen Glasalterung und/ oder der Beschichtung, liegen jedoch im Rahmen des Erlaubten. Die weitere Modifizierung dieser CL-Schicht mit PLL-PEG führte ebenfalls zu keinen wesentlichen Veränderungen der Parameter der Elektrodenfunktion (s. z.B. Abb. 35). Auch die Verwendung von GDNT zur Beschichtung führte zu keiner nachweisbaren Beeinflussung der Elektrodenfunktion im untersuchten pH-Bereich (s. Abb. 36).

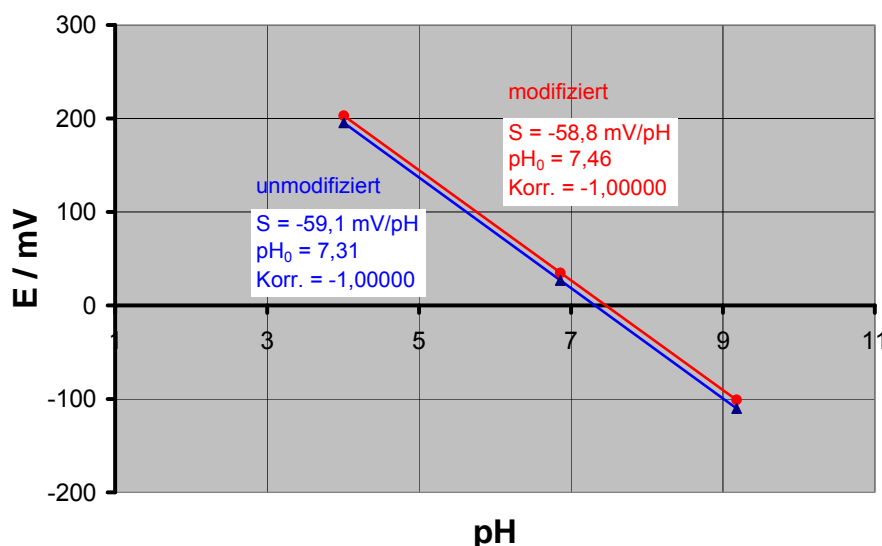


Abb. 35: Elektrodenfunktion einer mit Caldarchaeol beschichteten pH-Glaselektrode, vor und nach der Modifizierung mit PLL-PEG, gemessen im pH-Bereich $4,0 \leq \text{pH} \leq 9,2$ bei 25 °C vs. SSE (Idealwerte zum Vergleich: Steilheit S in mV/pH: -59,2; Korrelationskoeffizient Kor.: -1,00000).

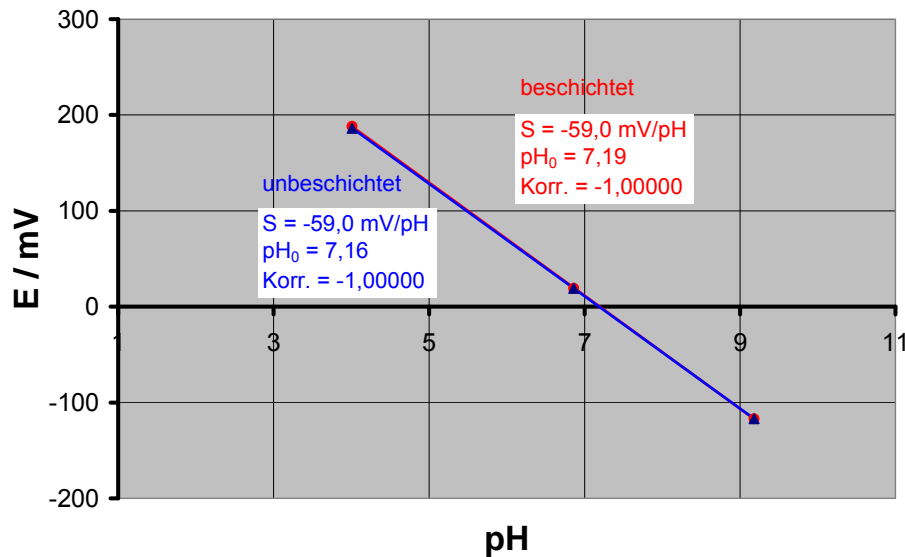


Abb. 36: Elektrodenfunktion einer pH-Glaselektrode, vor und nach der Beschichtung mit GDNT, gemessen im pH-Bereich $4,0 \leq \text{pH} \leq 9,2$ bei 25°C vs. SSE (Idealwerte zum Vergleich: Steilheit S in mV/pH : $-59,2$; Korrelationskoeffizient Korr. : $-1,00000$).

Die nach der Beschichtung mit GDNT festgestellte Erhöhung der Betriebswiderstände übertraf allerdings den bei einem unbeschichteten Vergleichsexemplar gleicher Charge ermittelten alterungsbedingten Wert deutlich. Es ist anzunehmen, dass sie weniger aus der Lipidschicht selbst als aus der mit der Lipidierung einhergehenden Behandlung der Glasoberfläche resultiert.

Referenzelektroden

Die Charakterisierung lipidierter Referenzelektrodenhülsen erfolgte anhand des AC-Betriebswiderstandes. Die Lipidierungen mit CPP (mit PLL-PEG modifiziertes CL) und GDNT ergaben anfänglich sehr unterschiedliche Resultate. Während CPP-Beschichtung den Betriebswiderstand kaum beeinflusste führte die GDNT-Beschichtung zu einer merklichen Widerstandserhöhung bis hin zur kompletten Verblockung. Eine Anpassung der Beschichtungstechnologie ergab tolerierbare Ergebnissen (s. Tab. 7), die jedoch noch zu verbessern sind.

Tab. 7: AC-Betriebswiderstand ($R[\text{AC}]$) von Referenzelektrodenhülsen vor und unmittelbar nach dem Beschichten mit GDNT bei Anwendung einer verbesserten bzw. der ursprünglichen Technologie (zum Vergleich); Messtemperatur: 25°C .

Hülse Nr.	$R[\text{AC}]$ Beschichtung in $\text{k}\Omega$	<u>vor</u>	$R[\text{AC}]$ Beschichtung in $\text{k}\Omega$	<u>nach</u>	Technologie
4	0,31		0,93		ursprüngliche
5	0,33		> 100		ursprüngliche
1GL	0,32		0,42		verbesserte
2GL	0,36		2,40		verbesserte
5GL	0,55		0,64		verbesserte
6GL	0,31		0,41		verbesserte
7GL	0,27		0,94		verbesserte

Leitfähigkeitsmesszellen

Die Charakterisierung lipidierter Pt-Leitfähigkeitsmesszellen erfolgte anhand der Zellkonstanten und ihrer Konzentrationsunabhängigkeit. Hierzu wurden Wechsellspannungsmessungen in KCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration durchgeführt

Weder die mit modifiziertem CL (CPP) noch die mit GDNT beschichteten Pt-Leitfähigkeitsmesszellen wiesen gegenüber dem unbeschichteten Zustand signifikante Veränderungen der Zellkonstante auf, die das übliche Maß der Messwertschwankungen im unbeschichteten Zustand deutlich überschreiten. Im untersuchten Leitfähigkeitsbereich (1,4...13 mS/cm) betrugen die Unterschiede der Zellkonstanten < 5% (s. Tab. 8). Diese geringe Beeinflussung deckt sich prinzipiell mit den Ergebnissen der EIS-Untersuchungen (s. Pkt. 6.3.1).

Tab. 8: Zellkonstanten von Pt-Leitfähigkeitsmesszellen bei 25 °C vor und unmittelbar nach dem Beschichteten mit CPP (CL/PLL-PEG) bzw. GDNT.

Messzelle	Kalibrierlösung	Zellkonstante Beschichtung in cm ⁻¹	Zellkonstante Beschichtung in cm ⁻¹	Beschichtung
Nr. 6	0,01 M KCl	1,12	1,12	CPP
Nr. 6	0,1 M KCl		1,13	CPP
Nr. 7	0,01 M KCl	1,23	1,20	CPP
Nr. 7	0,1 M KCl		1,21	CPP
Nr. 1	0,01 M KCl	1,14	1,17	GDNT
Nr. 1	0,1 M KCl		1,19	GDNT
Nr. 2	0,01 M KCl	1,20	1,18	GDNT
Nr. 2	0,1 M KCl		1,19	GDNT

Sauerstoffsensoren

Bei den amperometrischen Sauerstoffsensoren bewirkte die Beschichtung der Membranen mit modifiziertem CL (CPP) im untersuchten Temperaturbereich (10 °C bis 40 °C) eine deutlichen Reduzierung des Sensorsignals um etwa 10...25 % (s. Abb. 37), was im Rahmen früherer Ergebnisse für modifiziertes und unmodifiziertes TL liegt (s. Berichte zu „TEL“, Phase 2).

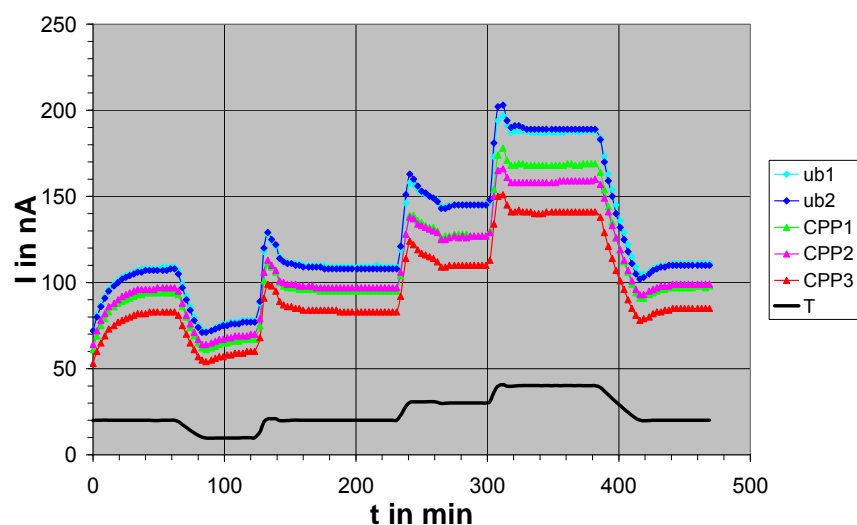


Abb. 37: Sensorfunktion von 5 Sauerstoffsensoren mit beschichteter bzw. unbeschichteter Membran im Temperaturbereich zwischen 10 °C und 40 °C in Wasser (ub: unbeschichtet; CPP: mit PLL-PEG modifiziertem CL beschichtet; T: Temperatur in °C).

Das anfänglich bei iba aufgetretene Problem der Korrosion armierten Silikonmembranen während der Beschichtung mit GDNT konnte durch Einsatz eines anderen Lösungsmittels während der Lipidierung gelöst werden. Bei den in amperometrischen Sauerstoffsensoren eingesetzten Membranen bewirkte die Beschichtung im untersuchten Temperaturbereich (10 °C bis 40 °C) eine Reduzierung des Sensorsignals um etwa 5...12 % (s. Abb. 38), welche somit deutlich geringer war als die für modifiziertes CL (CPP) und die bereits früher für modifiziertes und unmodifiziertes TL (s. Berichte zu „TEL“, Phase 2) gefundene.

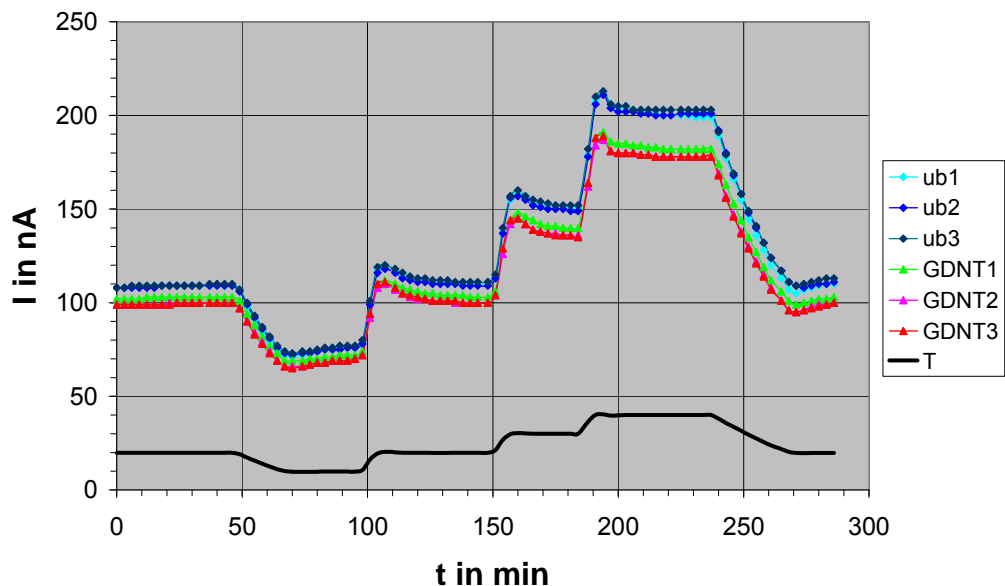


Abb. 38: Sensorfunktion von 6 Sauerstoffsensoren mit beschichteter bzw. unbeschichteter Membran im Temperaturbereich zwischen 10 °C und 40 °C in Wasser (ub: unbeschichtet; GDNT: mit GDNT beschichtet; T: Temperatur in °C).

Die bei der Lipidierung mit CPP bzw. GDNT beobachteten Empfindlichkeitsverluste bewegten sich innerhalb der zulässigen Grenzen üblicher Messverstärker und sind somit als messtechnisch unproblematisch einzustufen. Das Ansprechverhalten bei Temperaturwechsel sowie bei Änderung des Sauerstoffgehaltes im Prüfgas wurden durch die Beschichtungen praktisch nicht verändert.

6.4 Bioadhäsionsprüfung

Ziele des Arbeitspaketes

Mit dem Ziel, sowohl eine applikationsspezifische Aussage zur initialen bakteriellen Adhäsion zu erhalten, aber auch ein möglichst umfassendes Bild der Biofilmbildung zu gewinnen, gliedert sich die Bioadhäsionsprüfung in verschiedene Stufen.

Tab. 9: Übersicht der Bioadhäsionsstudien in Anhängigkeit des biologischen Modells und der Dauer

Verfahren Dauer	in vitro - Labortest		in situ - Feldtest	
	Modellwasser	Modellwasser	Laborisolate	Talsperre, Kläranlage
initial über 5 h Adhäsion über 24 h Biofilmbildung über mehrere Wochen	statisch	dynamisch dynamisch	dynamisch	reale Bedingung

6.4.1 Applikationsmodelle im Labor

4HJE

Für die Bioadhäsionsprüfung waren applikationsspezifische Wässer (Fluss, Talsperre) im Labor zu simulieren. Zu diesem Zweck wurden während der jeweiligen Wachstumsperioden Probekörper (Glas- bzw. Kunststoffplatten) in natürliche Habitate eingebracht (Fluss Ilm, Trinkwassertalsperre Neustadt). Nach einer Expositionszeit von 2,5 Monaten wurden die Probekörper geborgen, durch Abspülen mit filtriertem Rohwasser grob gereinigt und die Aufwuchsorganismen durch Abschaben der Oberflächen isoliert. Im Anschluss wurden die Organismen in filtriertes Rohwasser der Entnahmestelle überführt und bei Raumtemperatur kultiviert.

Die Bestimmung des Adhäsionsverhaltens der biologischen Modellsysteme erfolgte offline durch eine regelmäßige optische Kontrolle der Proben mit Hilfe von Durchlichtmikroskopen. Die Bewertung erfolgte semiquantitativ durch einen Vergleich der Menge adhärenter Zellen auf den beschichteten Proben mit der auf entsprechenden unbeschichteten Referenzsubstraten als Kontrolle.

Je Schichttyp wurden 2 Parallelen und eine Referenz (Trägermaterial Borofloat® B33) in Petrischalen auf einem Kreisschüttler mit ca. 45 U/min bei Raumtemperatur getestet.

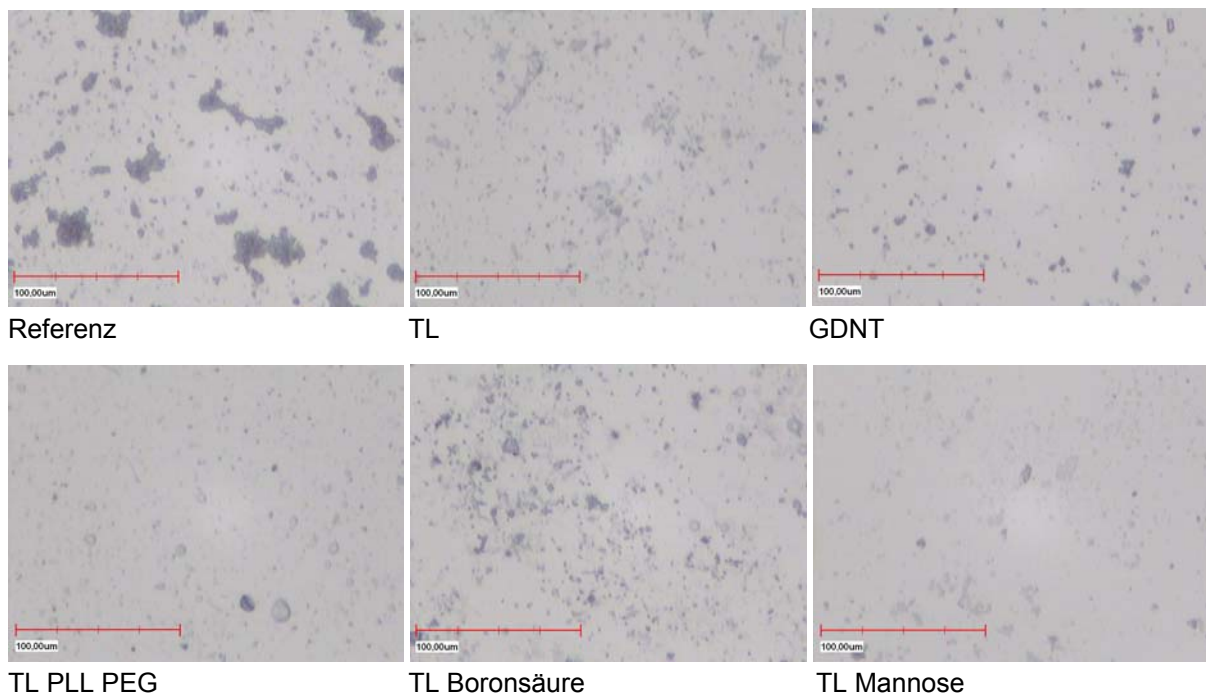


Abb. 39: Modell Fluss; Biofouling nach 4 Wochen Expositionsdauer

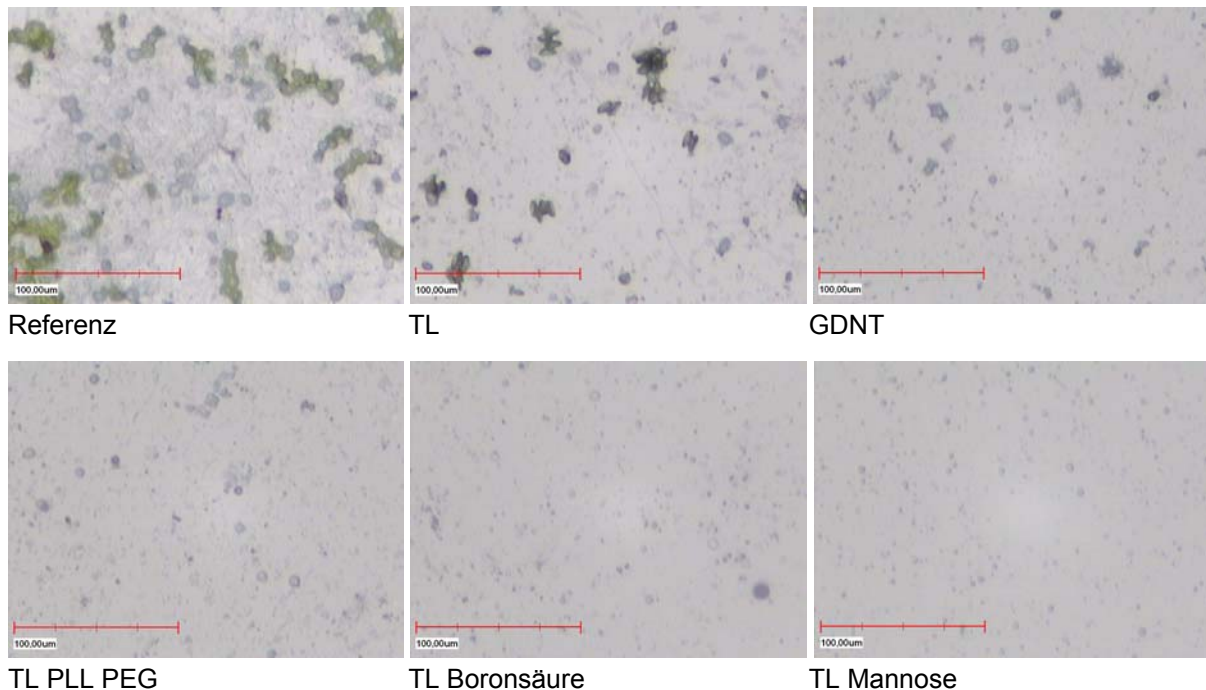


Abb. 40: Modell Talsperre; Biofouling nach 4 Wochen Expositionsdauer

Eine Reduktion adhärenter Zellen im Vergleich zur Referenz konnte für alle Tetraetherlipidschichten in beiden biologischen Modellen nachgewiesen werden, wobei auf der Oberfläche der beschichteten Proben vermehrt Einzelzellen auftraten, während sich im Fall der Referenzen Zellcluster bildeten. Das GDNT scheint etwas wirksamer zu sein als inaktiviertes Caldarchaeol (TL). Die stärkste Reduzierung adhärenter Zellen in einer ersten Testreihe lässt sich für die Modifikationen TL PLL PEG und TL Mannose bestätigen, wobei sich im Modell Talsperre auch TL Boronsäure als effektiv erweist. In einer zweiten Testreihe erweisen sich TL Chitosan und TL PO₄ in beiden Modellen etwas unterschiedlich aber dennoch wirksam (nicht dargestellt). Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich eine Modifikation des gebundenen Tetraetherlipids positiv auf den Antifoulingeffekt auswirkt. Diese Ergebnisse galt es in Feldtests zu bestätigen.

IOM

Detektion der Autofluoreszenz eines Biofilms

Im Hinblick auf die Bewertung der Antifouling-Wirkung einer Beschichtung ist ein Verfahren, welches das Wachstum von Mikroorganismen auf der Oberfläche online detektieren kann, möglicherweise sehr nützlich. Daher wurden in Zusammenarbeit mit dem iba Heiligenstadt Versuche zur Detektion eines Zellmonolayers auf einer festen, fluoreszenzarmen Unterlage durchgeführt. Das Ziel dieser Arbeiten bestand darin zu untersuchen, inwieweit das Wachstum eines Biofilms auf einer Oberfläche anhand der Messung der Autofluoreszenz des Biofilms detektiert werden kann. Eine wesentliche Zielstellung der Versuche war auch, die Zellen nicht in irgendeiner Weise anzufärben, sondern die intrinsischen Fluoreszenzeigenschaften der Zellen zu nutzen.

Hierfür wurden Messungen anhand eines Fibroblasten-Zellrasens in einer schwarzen Mikrotiterplatte (Costar, 96 Wells) durchgeführt. Angesetzt waren 12 Wells mit je 40.000 Zellen, die einen konfluenten Zellrasen ausbildeten. Für die Messungen wurde sowohl die faseroptische 7-Fasersonde als auch der

Messkopf mit dichroitischem Strahlteiler eingesetzt. Die Messung wurde mit dem Messgerät LF402 Metabolic (Produkt der IOM GmbH) durchgeführt, wobei die Fluoreszenzanregung bei 337 nm erfolgte. Die Fluoreszenz wurde bei 456/10 nm detektiert.

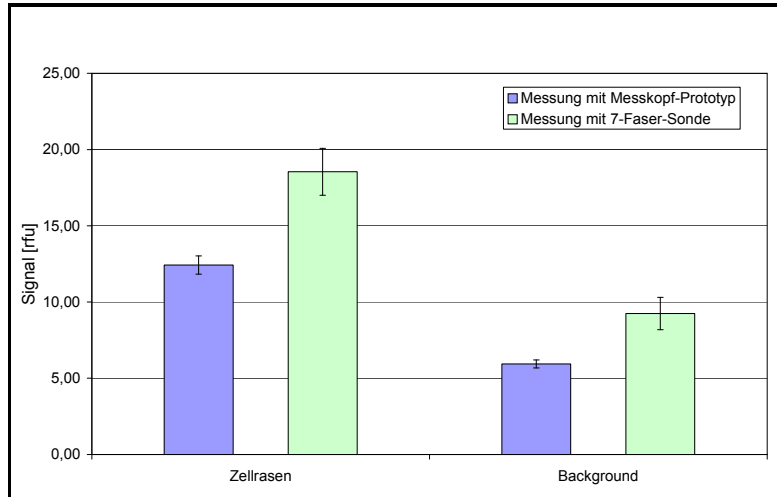


Abb. 41: Autofluoreszenzmessung eines Zellmonolayers mit zwei verschiedenen faseroptischen Sonden

Es konnte gezeigt werden, dass bei Entfernung des überstehenden Nährmediums die Autofluoreszenz des Zellmonolayers bei 456 nm messbar ist. Hierbei war die Entfernung des Nährmediums und ihr Ersatz durch physiologischen PBS-Puffer notwendig, weil es eine zu starke Eigenfluoreszenz besitzt, als dass die schwache Zellfluoreszenz vor einem derart starken Hintergrundsignal detektiert werden konnte.

Allerdings ist anhand der relativ geringen Differenz zwischen dem Signal mit Zellrasen und dem Hintergrundsignal zu erkennen, dass eine sichere Detektion der Zellauf autofluoreszenz nur bei annähernder Konfluenz der Zellen am Boden der Mikrotiterplatte erreicht werden kann. Eine Online-Beobachtung des Wachstums der Zellen dürfte aufgrund des doch geringen Signalunterschieds schwierig sein.

Für weitergehende Untersuchungen des Biofilm-Wachstums auf festen Oberflächen wurde im Labor von IOM ein einfacher Versuchsaufbau zur gezielten Erzeugung eines Biofilms auf Proben von Objektträgergröße (75 x 25 mm) realisiert. Es handelte sich im Wesentlichen um eine begaste Küvette, in die Proben in einem Halter eingehängt werden können. In die Küvette wurde natürliches Wasser aus einem nahen Fließgewässer (Teltowkanal) eingefüllt.

Ziel dieser Arbeiten war es, Proben zu schaffen, die für die Optimierung des fluoreszenzoptischen Monitorings mittels faser-optischer Sonden sowie für deren Charakterisierung genutzt werden können.

Für erste Versuche wurden zunächst handelsübliche B33-Borofloatglas-Objektträger eingehängt. Der Biofilmbewuchs wurde mit Weißlichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und zeit- und orts aufgelösten Fluoreszenzmessungen untersucht.

Eine typische Weißlichtaufnahme eines Objektträgers nach 35 Tagen Verweilzeit in der Küvette zeigt folgende Aufnahme:

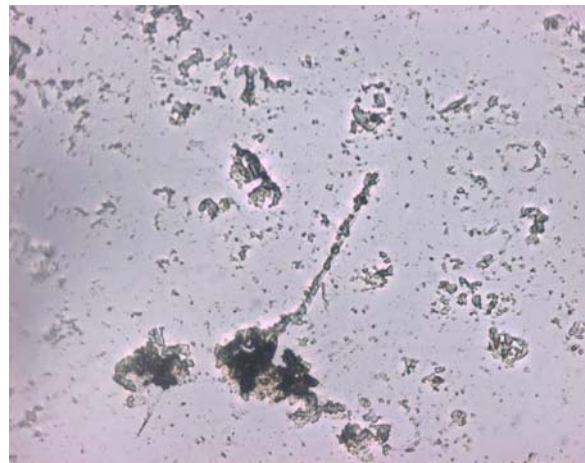


Abb. 42: Kammer zum Bewuchs von Slides mit Biofilmen Mikroskopische Aufnahme (20x) von auf einem B33-Slide adsorbierten Partikeln

In der Aufnahme sind adsorbierte Partikel unterschiedlicher Größe und Form und größere angelagerte Strukturen zu erkennen. Mit dieser Probe wurden vergleichende Messungen der Fluoreszenzintensität und –lebensdauer bei uv-Anregung (337 nm) mit dem Fluoreszenzreader LF 502 NanoScan FLT (IOM) durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 488 nm. Es wurden die Signale des inkubierten und eines nicht inkubierten Slides verglichen. Es erwies sich, dass die Signale beider Slides sowohl hinsichtlich der Fluoreszenzintensität als auch der Fluoreszenzabklingcharakteristik nicht unterschieden werden können. Ursache war vermutlich einerseits die zu starke Eigenfluoreszenz der Glasmatrix als auch andererseits die noch zu „dünne“ Besiedelung der Glasoberfläche.

Biofilm auf einem Quarzslide

Aufgrund der starken Eigenfluoreszenz eines Glaträgers wurden daraufhin Mikroskop-Objektträger aus Quarzglas in die Halterung eingesetzt und für mehrere Monate ebenfalls mit Teltowkanalwasser inkubiert. Auch bei diesem Träger bildeten sich nicht-homogene Bewuchsstrukturen aus.



Abb. 43: Mikroskopische Aufnahme der auf einem Quarzglasoträger anhaftenden organischen Materie nach einer Inkubation von 2 Monaten (10x-Objektiv)

Wiederum wurden mit dem Fluoreszenzreader LF 502 NanoScan FLT (Anregung: 337 nm, Detektion: 450 nm) vergleichende Messungen eines inkubierten und eines nicht inkubierten Slides durchgeführt. Der inkubierte Träger wurde nach der Entnahme aus dem Inkubationsgefäß mit destilliertem Wasser abgespült und sofort, in noch feuchtem Zustand ortsaufgelöst vermessen. Als Messschema wurde das Overlay einer 1536-Well-Platte gewählt, welches einem Raster von 2,25 x 2,25 mm entspricht:

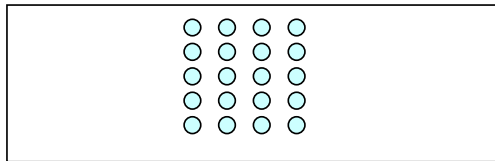


Abb. 44: Schematische Darstellung des Rasters der Messpunkte auf dem Slide

Im Vergleich zu einem Quarzglasträger der nicht inkubiert war, ergab sich bei dem für 2 Monate inkubierten Slide eine deutliche Streuung der Intensitäten der Fluoreszenzsignale, hervorgerufen durch den nicht-homogenen Bewuchs der Oberfläche. Daraus resultierte ebenfalls eine deutliche Streuung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten.

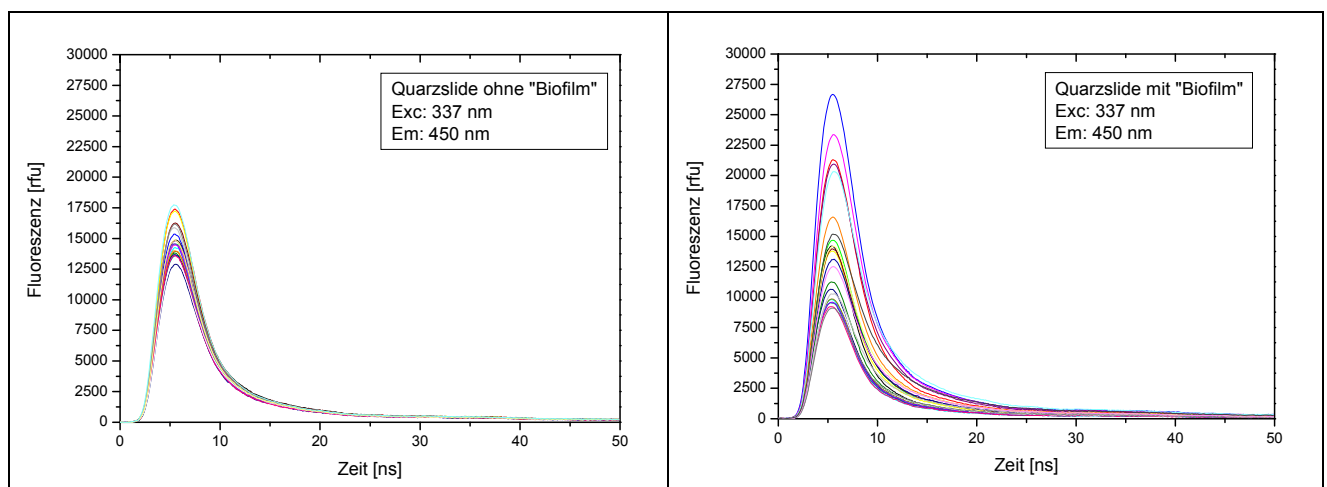


Abb. 45: Signale des nicht bewachsenen

Signale des bewachsenen Slides

Die Autofluoreszenzmessung auf dem bewachsenen Quarzslide erbrachte hinsichtlich der gemessenen Fluoreszenzintensitäten noch keine systematischen Unterschiede im Signal im Vergleich zum unbewachsenen Referenzslide. Die Intensität der Fluoreszenz schwankte zu stark.

Nach einer Inkubation über 14 Monate hinweg entstanden robuste Biofilme, die anschließend für Messzwecke genutzt werden konnten.



Abb. 46: Slides aus der Inkubationskammer nach ca. 14 Monaten (bei den beiden unteren Slides handelt es sich um B33-Borofloat-Glas, beim oberen Slide um Quarzglas)

Unter einem Fluoreszenzmikroskop (Jenalumar, Carl Zeiss Jena, DDR) konnten Biofilmstrukturen sichtbar gemacht werden. Die folgenden beiden Abbildungen wurden mit einem FITC-Filtersatz bei geringer Vergrößerung gewonnen:

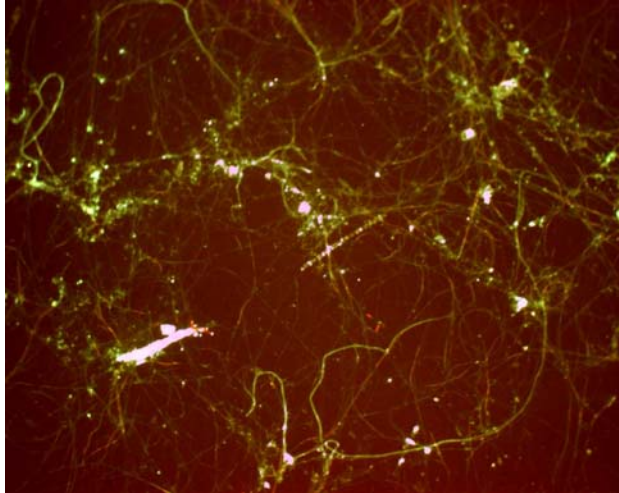
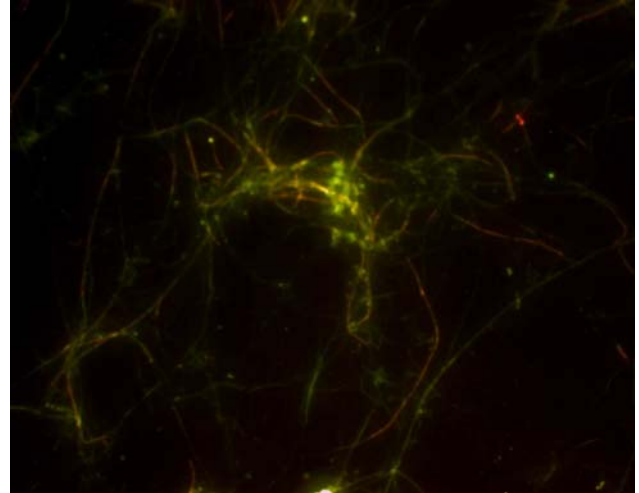


Abb. 47: Biofilm auf Quarzslide (Objektiv: 12,5x)



(Objektiv: 25x)

Die Autofluoreszenzmessung des Biofilms erfolgte anschließend orts aufgelöst mit dem Fluoreszenzreader LF 502 NanoScan FLT und tiefenaufgelöst mit zwei verschiedenen faseroptischen Sensoren. Das Ergebnis der orts aufgelösten Messung zeigte relativ stark schwankende Intensitätsverteilungen über dem Ort.

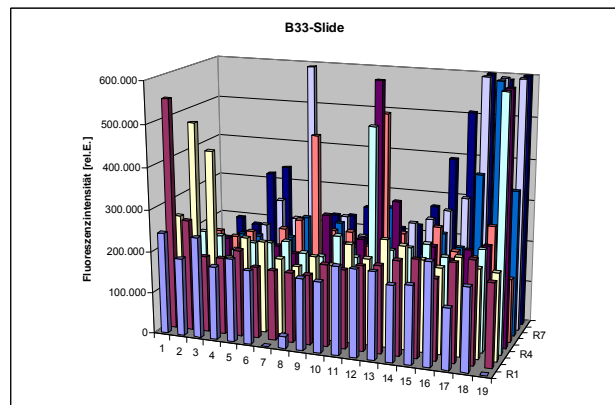
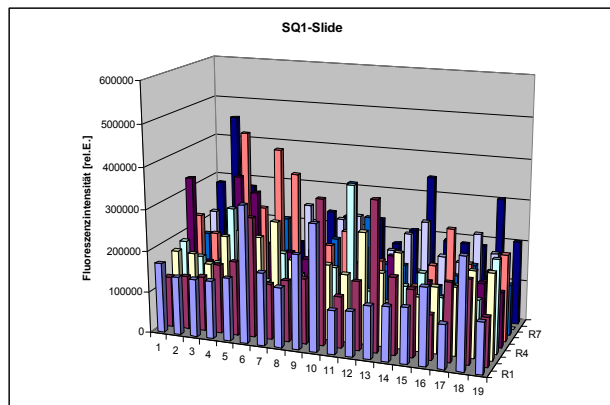


Abb. 48: Verteilung der Fluoreszenzintensität über dem Ort

Links: auf dem Quarzslide Fluoreszenzintensität = 189.324 ± 83.235

Rechts: auf dem B33-Borofloat-Slide Fluoreszenzintensität = 219.245 ± 136.762

Die mittlere Intensität auf dem B33-Slide war geringfügig höher als auf dem Quarzslide, wahrscheinlich durch ein etwas höheres Niveau an Eigenfluoreszenz. Die Unterschiede zu nicht inkubierten Kontrollslides waren signifikant.

Mit den beiden Typen der Fluoreszenzsensoren wurden ebenfalls z-Scans durchgeführt, um die Schärfentiefe der Sensoren bewerten zu können, d.h. der Fokus der Sensoren wurde auf einer Achse senkrecht zum Slide durch diesen hindurch verschoben.

Es wurden Scans an verschiedenen Stellen eines inkubierten Quarzglas-Slides (SQ1) und eines B33-Slides durchgeführt. Als Referenz wurden Scans an jeweils nicht inkubierten Slides durchgeführt.

Beispielhaft dargestellt werden Scans durch Quarzslides für beide Sensoren.

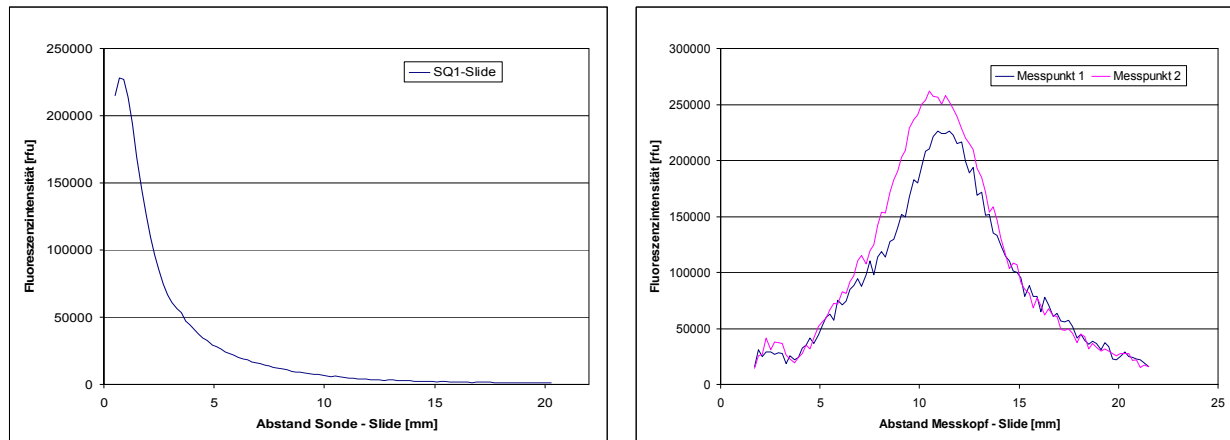


Abb. 49: z-Scan eines Biofilms auf einem Quarzslides

Links: mit der 7-Faser-Sonde

Rechts: mit dem Messkopf

Die oberen Kurven sind bereits die „Netto“-Kurven, d.h. sie sind rechnerisch ermittelt worden, indem von den Messkurven des inkubierten Slides jeweils die Messkurven des nicht inkubierten Referenzslides subtrahiert wurde. Mit diesen Messungen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, den dünnen organischen Biofilm auf einem Träger aus Quarzglas anhand der Autofluoreszenz zu detektieren, womit ein wesentliches Projektziel erreicht wurde. Mit dieser Methode ist es somit möglich, das Wachstum einer Biofilms auf einer Glasoberfläche (Borofloat-Glas oder Quarzglas) zu detektieren, sobald die Dichte der Besiedelung eine kritische Schwelle überschritten hat, die in etwa einem konfluenten Zellmonolayer entspricht.

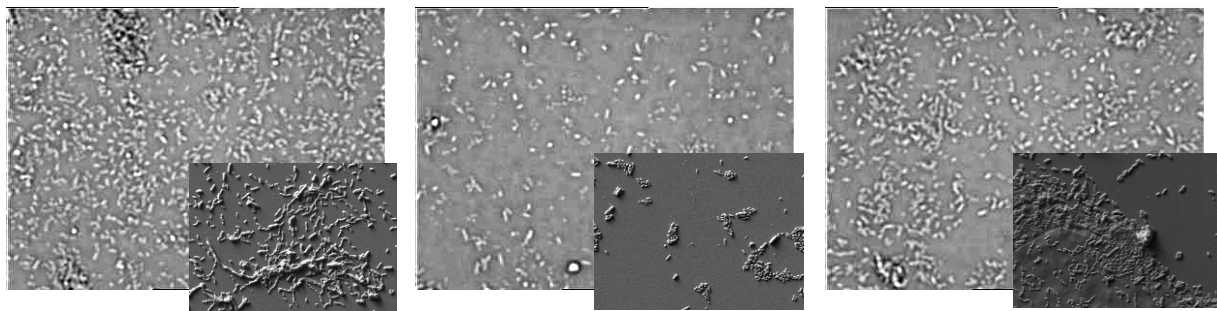
Die endliche Schärfentiefe der Sensoren erlaubt keine räumliche Trennung der Autofluoreszenz von der Ober- bzw. Unterseite des Objektträgers.

Für die 7-Faser-Sonde ist die optimale Position mit dem höchsten Signal diejenige mit einem Abstand von ca. 1 mm zwischen Sondenspitze und Probe. Der Messkopf stattdessen sollte einen Abstand von ca. 11 mm zur dünnen Biofilmprobe haben.

iba

Die Mischkultur im Flusswassermodell erreichte eine Ausgangskonzentration von 10^7 Keime/ml. Die Inkubation im statischen Modus im Kontakt mit der zu untersuchenden Oberfläche erfolgte in 24-er Multiwellplatten über 24h bei Raumtemperatur. Die Messung erfolgte an jeweils 5 Parallelen und wurde dreifach wiederholt. Dynamische Bioadhäsionsexperimente erweitern das Methodenspektrum. Die Kopplung von vier Plattenfließkammern ermöglicht den direkten Vergleich unterschiedlich beschichteter Substrate je vorab definierter Probengruppe. Die Mikroorganismen wurden in eine Mischkultur überführt und mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 3ml/min über die zu testende Oberfläche geführt. Je Fließzelle wurden nach 1, 2, 3, 4, 5, 22, 23 und 24 h und teilweise 96 h lichtmikroskopisch Bilder aufgenommen. Zusätzlich erfolgte einer CLSM- und REM-Analyse des entstandenen Biofilms.

Die erste Messreihe erlaubte den direkten Vergleich der lipidierten und unlipidierten Oberfläche in einer Fließzelle, wobei die Lipidschicht durch Photoablation entfernt wurde. Das unmodifizierte Lipid führte im Allgemeinen zu einer Reduzierung der statischen und dynamischen Bioadhäsion um ca. 30%. Im Ergebnis des direkten Vergleiches zeigen die lipidierten Oberflächen eine Reduzierung der Zellzahl, die Ergebnisse der unbeschichteten und der ablatierten Oberfläche sind dagegen vergleichbar.



B33 unbeschichtet

TL

TL photoablatiert

Abb. 50: Dynamische Bioadhäsion, 24h, lichtmikroskopische Aufnahme + REM

Mit dem Ziel der sterischen Entkopplung des Biosystems durch eine hydratisierte Schicht (Wasserbarriere) wurden zwei Gruppen der chemischen Modifizierung des Lipids getestet:

- die Bindung des Polyethylenglykols mit unterschiedlichen Kettenlängen und
- die Kopplung grenzflächenaktiver Substanzen insbesondere komplexer Zuckermoleküle.

Innerhalb der zweiten Probengruppe kam es u.a. zur Anwendung von Boronsäure als Spacer und Multiplikator der zusätzlich gekoppelten Moleküle. Beide Strategien präsentierten im *in vitro*-Bioadhäsionstest vergleichbare Erfolge – eine Reduzierung der Zahl adhärierter Zellen nach 24 h.

Im Einzelnen zeigte im Vergleich der Modifizierungen mit Polyethylenglykol erst die Nutzung eines PEG mit einer Kettenlänge >3000 eine signifikante Reduzierung der Bioadhäsion sowohl im statischen als auch im dynamischen Modus. Die effektive Kopplung des PEG über das Polylysin führte im statischen Modus zu einer Reduzierung auf 53% bei B33 TL PLL PEG 5000 bezogen auf das unbeschichtete Borosilikatglas, während das Kupfer als Referenz ein Reduzierung auf 41% erreicht. Die dynamischen Testungen mit der Flusswassermischkultur bestätigen diese Reduzierung insbesondere für die Modifikation B33 TL PLL PEG 5000 40%.

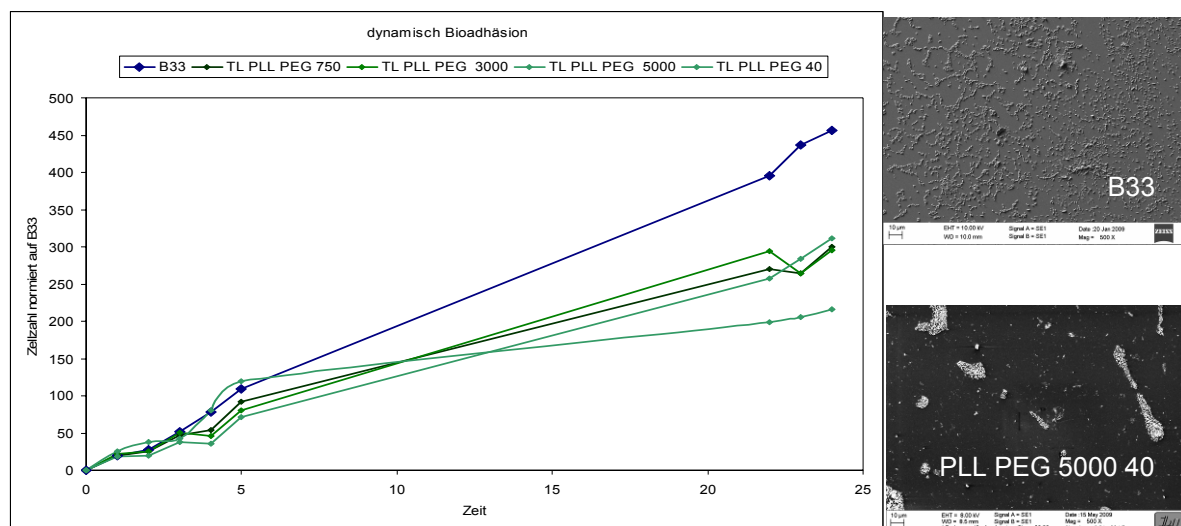


Abb. 51: *in vitro*-Bioadhäsionskinetik, dynamisch, PEG-Modifikationen

Alternative Funktionsmoleküle gekoppelt an die Tetraetherlipidschicht weisen erneut ein breiteres Ergebnisspektrum in der statischen und dynamischen Bioadhäsion auf. Die Kopplung von Komponenten über den Spacer Boronsäure führte in der Bioadhäsion zu keiner Verbesserung des Antifoulingverhaltens.

Die erreichte Bindung von Mannose bzw. Hydroxyectoin führte ebenso nur bedingt zu einer Reduzierung der initialen Bioadhäsion der Flusswasserorganismen. Allein die Kopplung des Funktionsmoleküls Chitosan an die außen stehende Kopfgruppe der Tetraetherlipidschicht überzeugte mit einem guten Antifouling in der *in vitro*-Bioadhäsionsprüfung im statischen und dynamischen Modus.

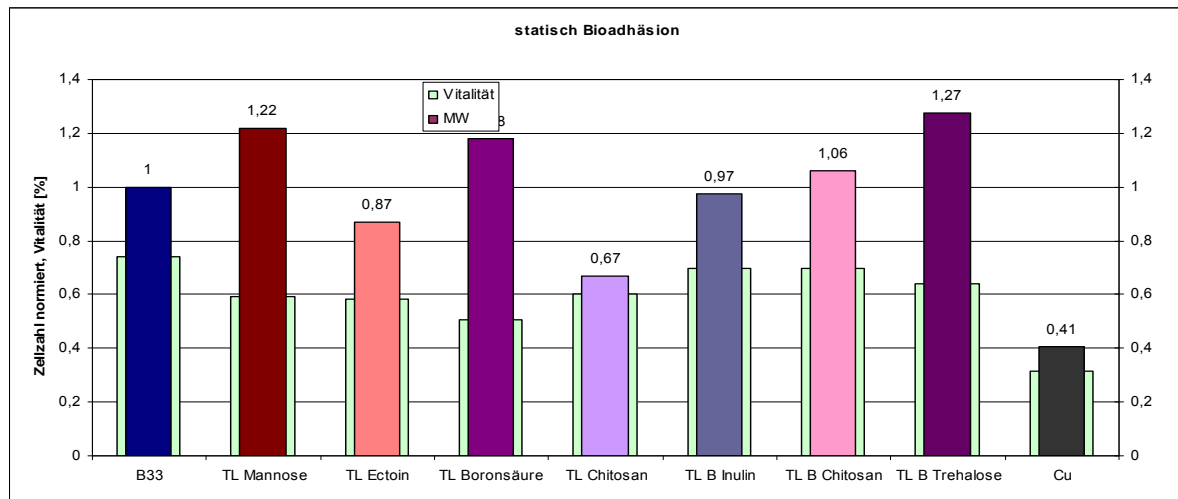


Abb. 52: *in vitro*-Bioadhäsion, statisch, Kopplung von alternativen Funktionsmolekülen

Im Feldtest konnten die Resultate der Modifikationen PLL PEG und Chitosan bestätigt werden.

6.4.2 Feldtests

4HJE

Zusätzlich zu den Laborsimulationen von Applikationsfällen, die unabhängig von Jahreszeiten sind, wurden auch praxisrelevante Feldtests zur Verifizierung der Entwicklungsergebnisse durchgeführt. Als Testfeld stand nach Absprache mit der Thüringer Fernwasserversorgung die Talsperre Neustadt/ Harz, Thüringen, angestauter Fluss Thyra, zur Verfügung. Zur Durchführung der Feldtests waren Konstruktion, Aufbau und Testung von Probenhalterungen erforderlich. Als Trägersubstrate für die verschiedenen Tetraetherlipid-Modifikationen wurden Slides aus Borofloat® B33 und zum Teil auch V4A mit den Abmessungen 75 x 25 x 1,1 mm verwendet. Die Proben wurden in die Freiwasserzone zwischen Staumauer und Entnahmeturm in einer Tiefe von 2 m unter der Wasseroberfläche eingebracht. Bei Wasserstandsänderungen erfolgte eine Nachführung der Proben durch Mitarbeiter der Thüringer Fernwasserversorgung/ Talsperre Neustadt. Feldtests wurden in den Jahren 2007, 2008 und 2009 durchgeführt. Die Expositionszeiträume erstreckten sich von Juni bis Oktober mit einer Expositionsdauer von 8 bis 10 Wochen.

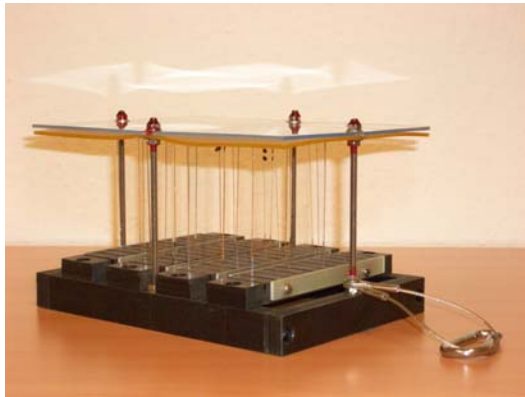


Abb. 53: Bestückte Probenhalterung mit Borofloat®33-Slides



Abb. 54: Talsperre Neustadt/ Harz, Thüringen

Um die Wachstumsperiode 2007 nutzen zu können, wurden die ersten Feldtests mit Tetraetherlipid-Modifikationen durchgeführt, die bereits zu Beginn des Projektes vorlagen: TL, TL negativ, TL PEG, TL Kombi und TL Phosphorylcholin, jeweils auf Borofloat B33 sowie TL, TL negativ und TL PEG auf Edelstahl. Der Feldtest erfolgte im Zeitraum von August bis Oktober 2007 mit einer Expositionsdauer von 9 Wochen. Die Proben wurden nach dem Bergen in den Halterungen belassen und in Talsperrenwasser zur Auswertung nach Jena verbracht.

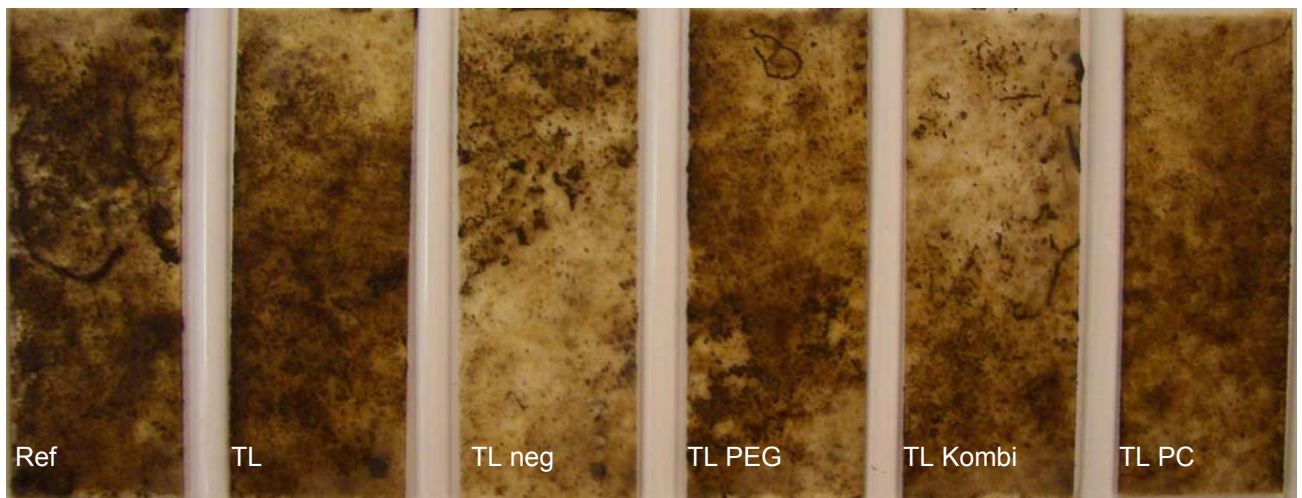


Abb. 55: Borofloat®33-Slides nach 9 Wochen Exposition im Feldtest Talsperre Neustadt; Ref = Referenz, TL = Caldarchaeol unmodifiziert, TL neg = TL negativ, TL PEG = TL hydrophil, TL Kombi = TL negativ und hydrophil, TL PC = TL Phosphorylcholin

Während für das unmodifizierte Caldarchaeol im Vergleich zur Referenz nur schwach eine Antifouling-Wirkung nachweisbar ist, ist für die negative Modifikation auf beiden Substraten und für die hydrophile Modifikation auf Edelstahl eine signifikante Reduzierung des Bewuchses festzustellen. Die Kombination aus negativ und hydrophil auf Borofloat®33 schwächt den Antifouling-Effekt der negativen Modifikation und erhöht den Antifouling-Effekt der hydrophilen Modifikation. Die Beschichtung mit TL Phosphorylcholin zeigt eine Reduzierung der Zell-Cluster. Die Auswertung der Parallelproben führte zum selben Ergebnis. Insgesamt ist festzustellen, dass der Bewuchs auf den beschichteten Substraten im feuchten Zustand leichter von den Oberflächen der Proben zu entfernen ist im Vergleich zur Referenz.

Diese ersten Ergebnisse zeigten, dass die Reduzierung der Biofilmbildung durch die TL-

					
bmb+f	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Modifikationen im Feldtest nicht so klar ausfällt, wie in Labortestreihen und eine weitere Arbeit an Modifikationen zur sterischen Entkopplung der Oberflächen erforderlich war.

Für den zweiten Feldtest an der Talsperre Neustadt/ Harz wurden folgende Tetraetherlipid-Modifikationen ausgewählt: Trägersubstrat Borofloat®33 mit TL (diaktiviertes Caldarchaeol), GDNT, TL PLL PEG, TL Boronsäure, TL Mannose, TL Chitosan und TL PO₄; Trägersubstrat Edelstahl mit TL, GDNT, TL negativ, TL PEG. Der Feldtest dauerte über einen Zeitraum von 9 Wochen von August bis Oktober 2008 an.

Wie bereits in vorangegangenen Feldtests fällt nach makroskopischer Bewertung auch im Fall der hier untersuchten Tetraetherlipide (GDNT und TL) sowie der TL-Modifikationen der Antifoulingeffekt nicht so deutlich aus wie in den Testreihen im Labor. Als Ursache steht zu vermuten, dass sich nicht-lebendes Material aus der Freiwasserzone an den Oberflächen der Proben absetzt und damit die Antifoulingwirkung überdeckt. Diese Ablagerung von Detritus (Pflanzenreste, Sedimente ...) ist in natürlichen Gewässern kaum zu vermeiden.

Die in Wasser aufbewahrten Proben aus dem Feldtest wurden zu weiteren Untersuchungen an Partner iba übergeben. Die am iba durchgeführte Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung dient der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen.

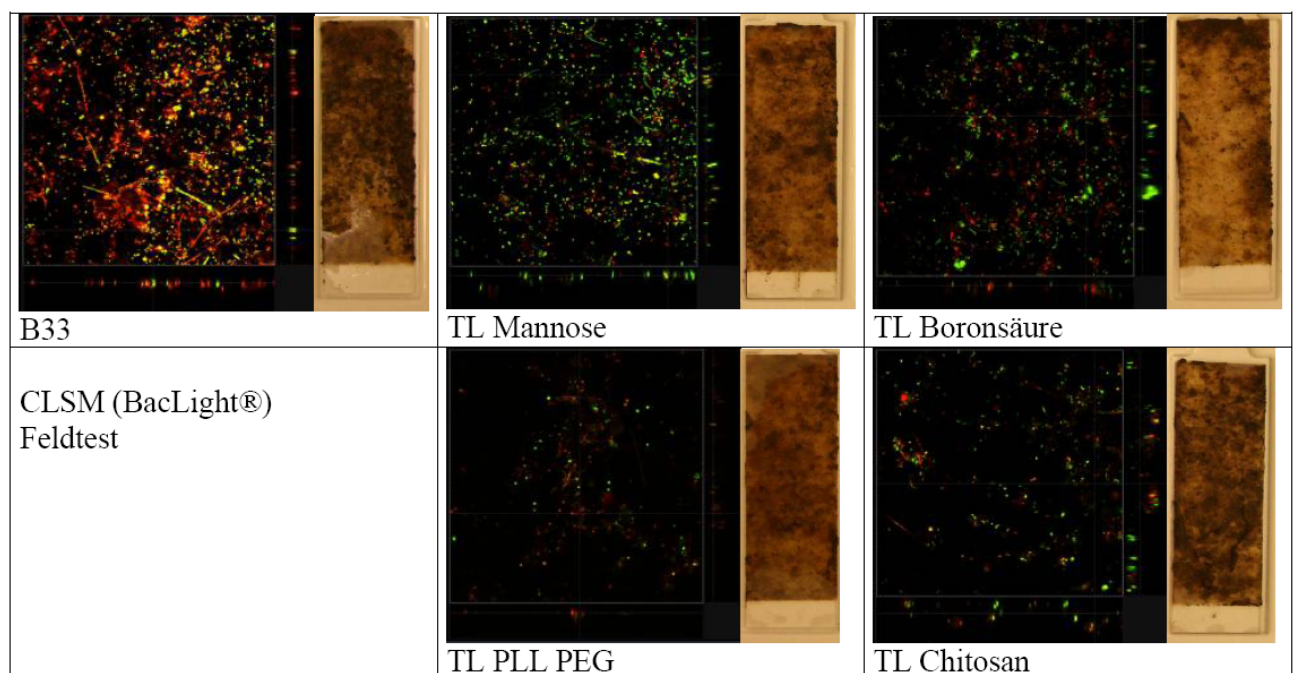
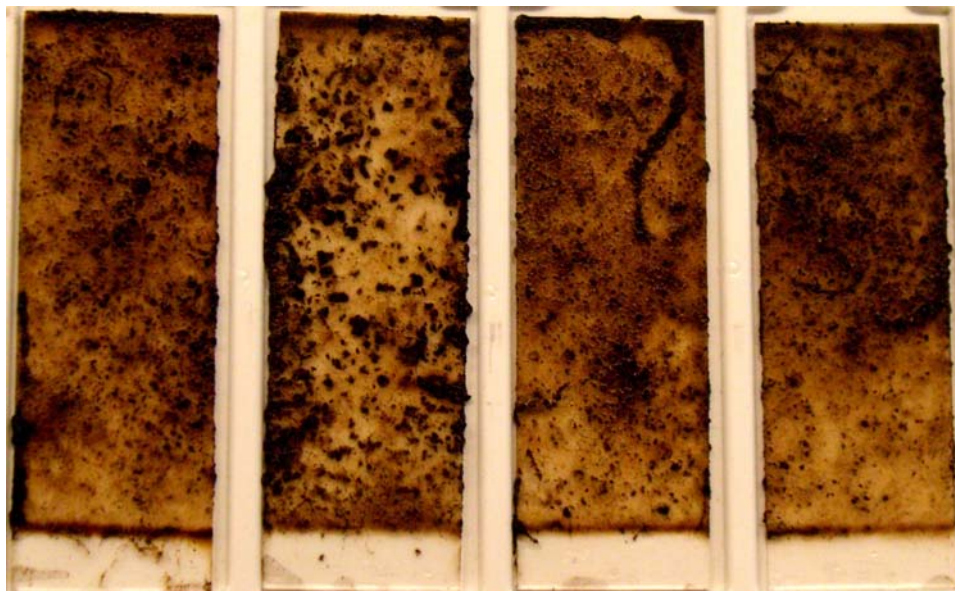


Abb. 56: CLSM- und Makroaufnahmen ausgewählter Feldtestproben (CLSM-Aufnahmen nach BacLight®-Färbung durchgeführt bei Partner iba)

In den Makroaufnahmen (jeweils rechts dargestellt) ist kaum ein Unterschied zwischen den beschichteten Trägersubstraten und der unbeschichteten Referenz zu verzeichnen. Ausgehend von diesem Erscheinungsbild ist eine echte Antifoulingwirkung der Tetraetherlipid-Modifikationen nicht nachzuweisen. Ein anderes Ergebnis zeigt die Vitalfärbung. Zum einen offenbart sich eine zum Teil deutliche Reduzierung adhärenter Zellen (insbesondere bei TL PLL PEG und TL Chitosan) und zum anderen eine Zellverteilung, die den Resultaten aus den Laborversuchen entspricht. Während sich auf der Referenz die Zellen eher in Clustern anordnen, liegen auf den beschichteten Substraten

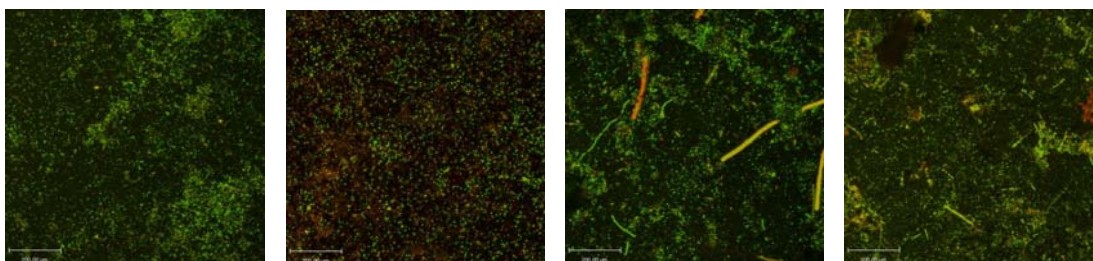
vorwiegend Einzelzellen vor. Weiterhin befindet sich auf der Referenz ein hoher Anteil an toten Zellen. Die Verschmutzung der beschichteten Proben scheint demnach in der Tat vorwiegend aus Detritus zu bestehen, für dessen Adhäsion die sterische Entkopplung der Oberflächen wahrscheinlich keine Rolle spielt.

Für den letzten Feldtest erfolgte die Auswahl der zu untersuchenden Schichtsysteme auf der Basis der Ergebnisse der bisherigen Biofunktionalitätsprüfungen der Partner iba und 4HJE unter Einbeziehung neuer, bisher noch nicht untersuchter Tetraetherlipid-Modifikationen. Folgende Proben standen mit je 2 Parallelen zur Verfügung: TL PO₄, TL B Inulin (Boronsäure als Spacer), TL B Trehalose, TL B Chitosan, TL PLL PEG 5000, TL PLL PEG 30, TL PLL PEG 40, TL Hyaluronsäure, TL Ectoin, TL, Dop TL PO₄ (mit Dopamin), B33 (Referenz), TL iba, GDNT, GDNT PO₄, B33 tegophobe®, TL Boronsäure, TL Chitosan, TL negativ, TL PEG und TL Mannose. Als Trägersubstrat dienten jeweils Borofloat®33-Slides. Um die Hauptwachstumsphase komplett abdecken zu können, wurden 2 Probenträger identisch bestückt: ein Träger für den Zeitraum Juni bis August und der andere Träger für den Zeitraum August bis Oktober. Die Auswertung der Parallelproben führte zum selben Ergebnis.



Referenz TL PLL PEG 5000 TL PLL PEG 30 TL PLL PEG 40

Abb. 57: Makroskopische Aufnahmen, Feldtest-Proben August bis Oktober 2009, 8 Wochen Expositionszeit



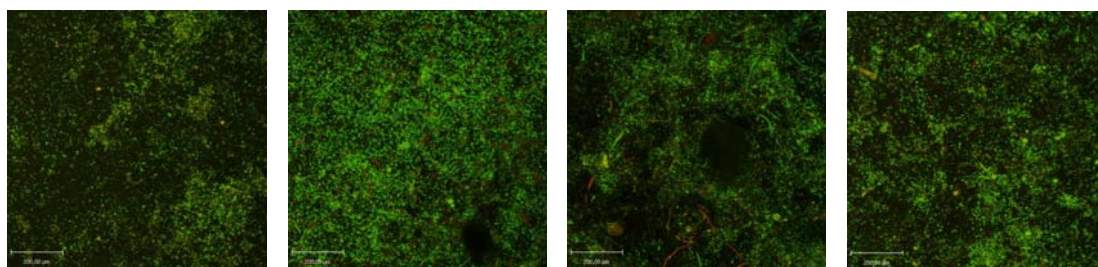
Referenz TL PLL PEG 5000 TL PLL PEG 30 TL PLL PEG 40

Abb. 58: CLSM-Analyse nach BacLight®-Färbung (iba), Feldtest-Proben August bis Oktober 2009, 8 Wochen Expositionszeit



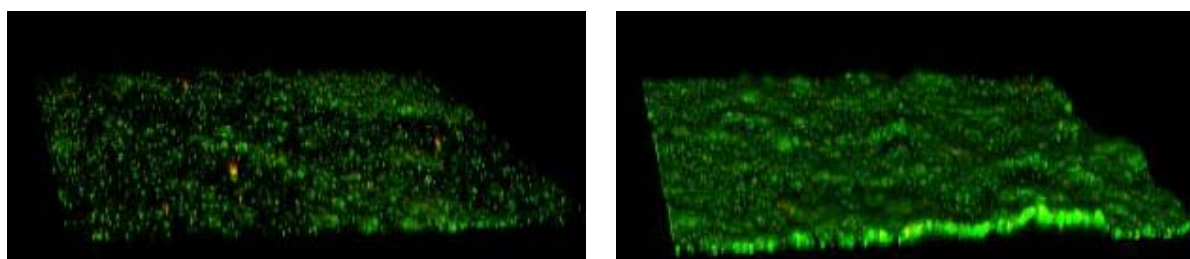
Referenz TL B Inulin TL B Trehalose TL B Chitosan

Abb. 59: Makroskopische Aufnahmen, Feldtest-Proben August bis Oktober 2009, 8 Wochen Expositionszeit



Referenz TL B Inulin TL B Trehalose TL B Chitosan

Abb. 60: CLSM-Analyse nach BaLight®-Färbung (iba), Feldtest-Proben August bis Oktober 2009, 8 Wochen Expositionszeit



Referenz TL Ectoin

Abb. 61: CLSM-Analyse nach BaLight®-Färbung (iba), Fläche 1 mm x 1 mm, Feldtest-Proben August bis Oktober 2009, 8 Wochen Expositionszeit

In den makroskopischen Aufnahmen der Proben sind kaum Einflüsse der Tetraetherlipid-Modifikationen auf die Verschmutzung der Oberflächen auszumachen – mit Ausnahme der Schicht TL PLL PEG 5000 (s. Abb. 57), die auch in den Laboruntersuchungen am iba eine deutliche Reduzierung der Adhäsion aufwies. Manche Modifikationen, so zum Beispiel mit Inulin, Trehalose und Chitosan, die über Boronsäure als Spacer an Caldarchaeol gekoppelt sind, weisen deutlich mehr adhärentes Material als die unbeschichtete Referenz auf (s. Abb. 59). Die CLSM-Analysen nach Vitalfärbung mit

					
bmb+f	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

BacLight® ermöglichen eine Differenzierung des anhaftenden Materials in Organismen und Detritus und weisen sowohl eine Reduzierung des Biofilms (Beispiel TL PLL PEG 5000 oder GDNT PO₄) als auch eine Erhöhung der Attraktivität der Oberflächen für Aufwuchs (Beispiel Ectoin, s. Abb. 61) nach. Aufgrund des sehr niedrigen Wasserstandes im Sommer 2009 war die Belsatung des Wasserkörpers mit Sedimenten u.a. höher als in den Jahren zuvor, was auch zu einer stärkeren Verschmutzung der Proben geführt hat. Es wäre zu prüfen, inwieweit strömendes Wasser (z.B. bei Einsatz in einem Fluss oder der geplanten Applikation in Durchflussmessstrecken) aufgrund der Scherkräfte dem Antifoulingeffekt der Schichten entgegenkommt.

Da bei Partner MLU zum Ende der Projektlaufzeit keine Möglichkeit zur Beschichtung von 3D-Substraten für den Test in einem Demonstrationssystem mehr zur Verfügung stand, wurden Glaszylinder mit GDNT PO₄ aus wässrig alkoholischer Lösung beschichtet, eine Technologie die am iba Heiligenstadt etabliert war. GDNT PO₄ hatte im letzten Feldtest auch signifikantes Antifoulingpotential nach Auswertung der Tests mit Vitalfärbung gezeigt (s. Abb. 62).

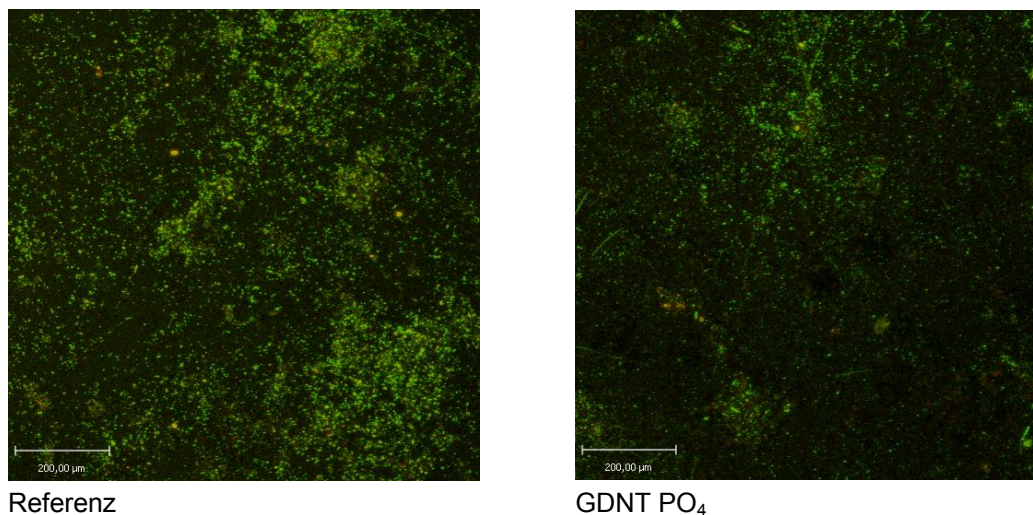


Abb. 62: CLSM-Analyse nach BacLight®-Färbung (iba), Feldtest-Proben August bis Oktober 2009, 8 Wochen Expositionszeit

STM

Zur Bestätigung der unter Laborbedingungen gefundenen positiven Untersuchungsergebnisse unter praxisnahen Einsatzbedingungen wurden bei STM zusätzliche Feldtests durchgeführt. Diese außerplanmäßig in das Projekt aufgenommenen Untersuchungen sollten insbesondere zum direkten (visuellen) bzw. indirekten (via Messeigenschaften) Nachweis der bewuchsmindernden Wirkung der Antifoulingbeschichtungen dienen. Um in der verbleibenden nur noch wenige Monate dauernden Vegetationsperiode möglichst deutliche Ergebnisse zu erzielen, wurde ein organisch besonders stark belastetes Becken einer kommunalen Kläranlage (Kläranlage Waldheim) als Untersuchungsort gewählt. Hier bestand die Möglichkeit, vergleichende Langzeituntersuchungen an unterschiedlichen be- und unbeschichteten Sensoren unter praxisnahen Bedingungen bis mindestens Jahresende 2009 durchzuführen. Es wurden 4 Messstellen mit insgesamt 4 Armaturen, 16 elektrochemischen Sensoren sowie der zugehörigen Messelektronik errichtet.

Alle Sensorsignale wurden in regelmäßigen Abständen (ca. alle 6 Minuten) simultan aufgezeichnet und periodisch per Datenfernübertragung ausgelesen. Als Sensoren kamen Sauerstoffsensoren, Redoxeinstabmessketten, Referenzelektroden und pH-Glaselektroden zum Einsatz. Den

beschichteten Exemplaren wurde stets mindestens ein unbeschichtetes Vergleichsexemplar gleicher Art beigelegt. Bei den pH-Messketten wurden zur Trennung von Signaländerungen, die aus dem Bewuchs des pH-Glases resultieren von solchen infolge Veränderungen an den Referenzelektroden alle zu vergleichenden pH-Elektroden gegen eine gemeinsame Referenzelektrode geschaltet.



Abb. 63: Feldtests an elektrochemischen Sensoren in der Kläranlage Waldheim
(links: benutztes Klärbecken, rechts: Messgeber und Messelektronik im Einsatz).



Abb. 64: 4-Fach-Messkopf zum vergleichenden Langzeittest unterschiedlich beschichteter pH-Elektroden nach dem ersten Einsatz (3 pH-Elektroden und 1 Referenzelektrode).

Als Antifoulingbeschichtungen wurden in Absprache mit MLU und iba die beiden aussichtsreichsten Lipid-Modifikationen CL/PLL-PEG (**CPP**) und CL/Chitosan (**CCS**) eingesetzt. In regelmäßigen zeitlichen Abständen (bis Ende Oktober ca. monatlich) wurden die Sensoren visuell auf Bewuchs geprüft. Im Ergebnis dieser ersten Prüfungen konnten bisher noch keine mit bloßem Auge sichtbaren Unterschiede zwischen den be- und den unbeschichteten Sensorexemplaren hinsichtlich Bewuchs und Verschmutzung festgestellt werden. Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

6.5 Biofilmsimulation

Ziele des Arbeitspaketes

- Entwicklung eines Adhäsionsmodells basierend auf der Berücksichtigung thermodynamischer und kolloidchemischer Modellvorstellungen, welches die Beschreibung der initialen bakteriellen Adhäsion erlaubt
- Entwicklung eines Biofilmsimulators als eigenständiges Programm mit einer bedienerfreundlichen graphischen Oberfläche
- experimentell und theoretisch abgesicherte Bewertung von Lipid-Systemen mit optimalem Antifoulingpotenzial

6.5.1 Prognosemodell

iba

Theoretische Vorarbeiten

Es muss davon ausgegangen werden, dass zwischen zwei sich nähernden Oberflächen bei einem Abstand von wenigen Nanometern in wässrigen Medien, die Grenzflächenenergie wesentlich von Hydratationseffekten bestimmt wird, die in ihrer Intensität die klassischen DLVO-Kräfte deutlich übertreffen können. In der Literatur beschriebene Lösungs- und Quellungsvorgänge bzw. strukturelle Interaktionen gegenüber Wasser sowie Wechselwirkungen, die ihrerseits mit der Affinität gegenüber Wasserstoffbindungen im Zusammenhang stehen, werden in diese Betrachtung einbezogen. Sterische Kräfte resultieren aus Wechselwirkungen, die vorwiegend durch nicht-ionische oberflächenaktive Substanzen und polymere Makromoleküle induziert werden, die zur Kopplung an suspendierte Oberflächen unter Bildung von 10 bis 20 nm dicken Monolayern tendieren. Mit dem Ziel, diese Energieterme in das Prognosemodell für eine Beschreibung der initialen Adhäsion zu integrieren, erfolgte eine entsprechende Recherche verschiedener Modellansätze von Hydratationsphänomenen. Das Fundament der Betrachtungen bildet die Derjaguin-Approximation, mit deren Hilfe die Kalkulation von Wechselwirkungskräften für ein Kugel-Platte-Modell aus der Energie je Flächeneinheit zweier planarer Platten ermöglicht wird.

Die Interaktionskräfte, welche Adsorption und Adhäsion im flüssigen Medium zwischen z.B. einem Bakterium sowie einem Substrat definieren, lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

$$\Delta G_{ads} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{EL} + \Delta G^{AB} + \Delta G^{BR}$$

mit ΔG^{LW} als attraktive Lifshitz-van der Waals Kräfte (*LW*), ΔG^{EL} als repulsive Kräfte der elektrischen Doppelschicht (*EL*), ΔG^{AB} als Lewis Säure/ Base Wechselwirkung (*AB*) sowie ΔG^{BR} als Kräfte aus der Braun'schen Bewegung (*BR*). Die Lewis Säure/ Base Wechselwirkungen (*AB*) dominieren zu ca. 90% sowohl attraktive als auch repulsive nicht kovalente Interaktionskräfte im Wasser, womit sich obige Gleichung reduzieren lässt zu

$$\Delta G_{ads} \approx \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB}$$

Mittels der Etablierung von PEG auf der Oberfläche eines Substrates lassen sich die physiko-chemischen Eigenschaften dieser Oberfläche modifizieren. In der Abb. 65 sind unterschiedliche Möglichkeiten der Ausbildung von PEG-Ketten auf einem Substrat dargestellt.

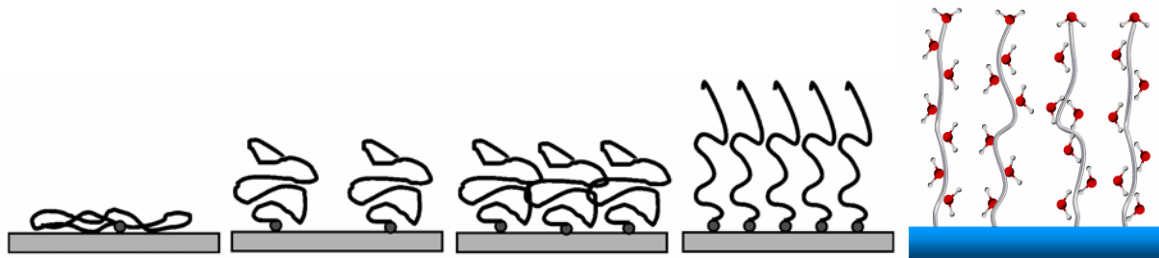


Abb. 65: Schematische Darstellung der Konformation von PEG-Ketten auf einem Substrat.

V.l.n.r.: "Pancake"-Struktur, nicht-interagierende "mushroom"-Struktur, interagierende "mushroom"-Struktur, Brush-Struktur, hydratisierte Brushstruktur

Die Affinität der Wassermoleküle im wässrigen Milieu zu den aufgetragenen hydrophilen Polymerketten führt zur Etablierung einer oberflächennahen Wasserschicht.

Der energetische Zustand hinsichtlich einer Adsorption von Proteinen bzw. einer Adhäsion von Bakterien auf der Oberfläche mit hydratisiertem PEG (ΔG_{ads}) lässt sich thermodynamisch mittels Enthalpie (ΔH_{ads}) und Entropie ($T\Delta S_{ads}$) erfassen:

$$\Delta G_{ads} = \Delta H_{ads} - T\Delta S_{ads}$$

Aus voranstehender Gleichung lässt sich erkennen, dass zur Vermeidung der Adhäsion/ Adsorption auf einer Oberfläche die Interaktion Protein/ Substrat zur einer Erhöhung der Enthalpie und einer Verringerung der Entropie des Systems führen muss.

Somit lässt sich das "Bewachsen" einer Oberfläche mit Proteinen durch die Maximierung der Lewis Säure/ Base Wechselwirkung (ΔG^{AB} , vgl. Gl.X2) zwischen Substrat und adhäriertem Wasser unterdrücken. Ausschlaggebend für eine solche Maximierung sind die Variation des Lewis-Base Parameters (γ^-) und des Lewis-Säure Parameters (γ^+) da:

$$\Delta G^{AB} = 2 \begin{bmatrix} (\sqrt{\gamma_s^+} - \sqrt{\gamma_p^+})(\sqrt{\gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_p^-}) \\ -(\sqrt{\gamma_s^+} - \sqrt{\gamma_l^+})(\sqrt{\gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_l^-}) \\ -(\sqrt{\gamma_p^+} - \sqrt{\gamma_l^+})(\sqrt{\gamma_p^-} - \sqrt{\gamma_l^-}) \end{bmatrix}$$

Prinzipiell ist der Erfolg einer solchen Wasserbarriere hinsichtlich der Vermeidung unerwünschter Adhäsionsvorgänge an folgende Bedingungen geknüpft:

- 1) die Affinität des Wassers zur Polymerkette ist größer als die zum Protein
- 2) die Affinität der Polymerkette zum Protein ist geringer als die zum Wasser
- 3) die Etablierung einer stabilen oberflächennahen Wasserschicht mittels hydratisiertem PEG setzt die Brush-Struktur der Beschichtung voraus.

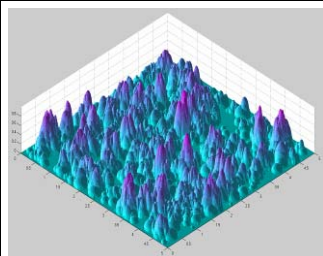
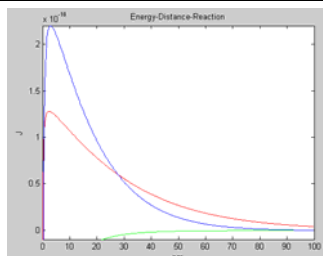
Prognose der Initialadhäsion

Die Initialadhäsion von Zellen auf Oberflächen unterliegt zwei wesentlichen Einflussfaktoren, der Physikochemie zwischen Zelle und Oberfläche sowie der topografischen Oberflächenstruktur. Dementsprechend wurden diese Komponenten in einem Oberflächengenerator und einem Energie-Distanz-Kalkulator zur Prognose der initialen Adhäsion eingesetzt. Zusätzlich ermöglicht ein Oberflächenenergiekalkulator die Ermittlung der oberflächenenergetischen Parameter der beteiligten Substrate und Mikroorganismen basierend auf den theoretischen Modellvorstellungen nach C.J. van Oss, Owens/ Wendt usw.

Der Oberflächengenerator nutzt die vielfältigen Möglichkeiten der Erzeugung synthetischer Oberflächen. Die Modellierung einer Oberfläche ist beispielsweise mit sogenannten Asperities sowie mit Hilfe von fraktalen Strukturelementen möglich. Hierbei kann der Nutzer aus den Möglichkeiten der Anordnung der Asperities wählen: zufällig, uniform verteilt und parallel angeordnet. Im Output entsteht ein 3D-Modell der Oberfläche inklusive aller notwendigen Rauigkeitsparameter.

Die Abschätzung des Adhäsionspotenzials einer Oberfläche erfolgt über die Kalkulation der freien Oberflächenenergie mit unterschiedlichen theoretischen Modellvorstellungen. Der Energiekalkulator erlaubt die Berechnung von Energie-Abstands-Funktionen für das gewählte Modell und bezieht neben der van der Waals-Energie und Doppelschichtenergie zusätzlich Hydratationswechselwirkungen ein.

Tab. 10: Programme zur Kalkulation der Grenzflächenparameter

	Surface-Generator	Energie-Kalkulator	Energie-Distanz-Kalkulator												
Inhalt	Erzeugung künstlicher Topografien (mikro und nanoskalig)	Berechnung der freien Oberflächenenergie (ΔG)	Berechnung der Physikochemie zwischen Zelle und Oberfläche $\Delta G(z)$												
Input	Wahl des Oberflächenmodells geometrische Parameter	Wahl des Berechnungsmodells Flüssigkeitsspektrum Signifikanz	Messgrößen der physikalisch chemischen Charakterisierung thermodynamische Kenngrößen / Konstanten												
Output	3D-Modell einer Oberfläche Rautiefenparameter	Gesamtoberflächenenergie Säure- / Base-Parameter dispersive Anteile	Energie-Distanz-Darstellung Betrag der Energie in Distanz z												
Beispiel		<table><tr><td>gamma_S</td><td>13.2241</td></tr><tr><td>gamma_S^d</td><td>10.8648</td></tr><tr><td>gamma_S^A</td><td>0.867343</td></tr><tr><td>gamma_S^B</td><td>1.6043</td></tr><tr><td>Condition (L2-Norm)</td><td>18.6581</td></tr><tr><td>Condition (L1-Norm)</td><td>25.4619</td></tr></table>	gamma_S	13.2241	gamma_S^d	10.8648	gamma_S^A	0.867343	gamma_S^B	1.6043	Condition (L2-Norm)	18.6581	Condition (L1-Norm)	25.4619	
gamma_S	13.2241														
gamma_S^d	10.8648														
gamma_S^A	0.867343														
gamma_S^B	1.6043														
Condition (L2-Norm)	18.6581														
Condition (L1-Norm)	25.4619														

6.5.2 Biofilmsimulation-Software

iba

Auf der Basis von Matlab®-Routinen sowie dem FEM-Paket COMSOL Multiphysics (COMSOL AB) konnte die Adhäsion von Mikroorganismen auf Oberflächen simuliert werden. Mittels des Energiekalkulators werden die Wechselwirkungsenergien für das System Grenzfläche Biosystem/ Biomaterial bestimmt und zur Initialadhäsion von Mikroorganismen im Simulationsgebiet sowohl zum Beginn der Simulation als auch während der gesamten Simulationsdauer abgeschätzt.

Die Biofilmsimulation stellt einen iterativen Prozess dar, in welchen Strömung, Nährstofftransport, adherierende Organismen sowie Wachstum und Teilung der Organismen pro Zeitschritt kalkuliert werden. Diese Software ermöglicht, in Abhängigkeit der physiko-chemischen Eigenschaften der Oberfläche, die Prognostizierung der Formation eines Biofilms.

Die Erweiterung um ein regelbasiertes Modell ermöglicht es zudem, unbekannte physikalische und chemische Zusammenhänge aus den mikrobiologischen Adhäsionsversuchen zu integrieren.

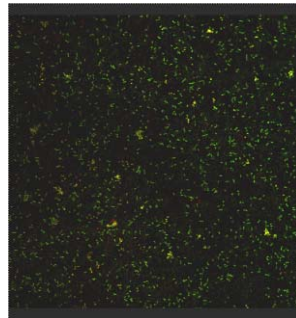
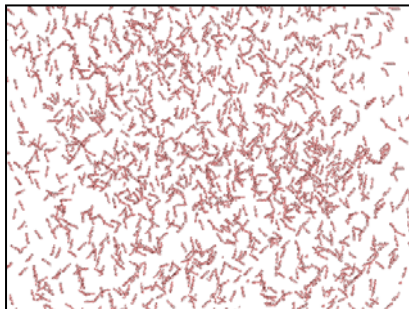


Abb. 66: Beispiel für hydrophobe Oberfläche

Links: simulierter Biofilm

Rechts: experimenteller Biofilm

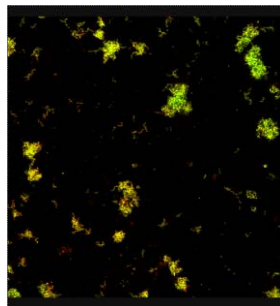


Abb. 67: Beispiel für hydrophile Oberfläche

Links: simulierter Biofilm;

Rechts: experimenteller Biofilm

6.5.3 Validierung des Modells

iba

Mit dem Ziel der Interpretation der adhäsionsbestimmenden Kräfte ergänzten die vornehmlich experimentell begründeten Korrelationsbetrachtungen das Einbringen experimenteller Befunde in theoretische Modellvorstellungen. Es wurde deutlich, dass weder der thermodynamische Ansatz des Grenzflächenenergiekonzeptes noch die klassische DLVO-Theorie die Möglichkeiten bieten, die Bioadhäsion hinlänglich zu modellieren. Unter Einbeziehung hydrophober und hydrophiler Wechselwirkungen in das Modell der Bioadhäsion bildete van Oss die erweiterte DLVO-Theorie, welche von zahlreichen Arbeitsgruppen übernommen und weiterentwickelt wurde [van Oss, C., *J. Mol. Recognition*, 2003, 16, 177 / Rijnaarts, H. *Coll. Surf. B: Biointerface* 1999, 14, 179 / Azeredo J. *Coll. Surf. B: Biointerface*, 1999 14 141]. Bisher beziehen die Autoren als grundlegende Komponenten neben der van der Waals- und der elektrostatischen Energie die Säure-Base-Wechselwirkung ein, wobei diese auf dem Beitrag der Elektronendonatoren und -akzeptoren beruht.

Unter Anwendung der theoretischen Formulierungen erfolgte auf der Basis der experimentell zugänglichen Parameter für die Substrate, die Mikroorganismen und Medien und unter Nutzung relevanter Literaturdaten die Kalkulation der freien Grenzflächenenergie beispielhaft für die Referenz Borofloat B33, das unmodifizierte Tetraetherlipid und je eine Beispielmofifikation: das TL PLL PEG 5000 und die Probe TL Chitosan (Tab. 11).

Die berechneten Grenzflächenenergien können im Ergebnis wie folgt interpretiert werden:

- Die erreichte Größenordnung der Energiewerte stimmt mit Literaturdaten überein.
- Erwartungsgemäß zeigen die Ergebnisse für die unmodifizierte und die funktionalisierten Tetraetherlipidschichten positivere, d.h. repulsivere Wechselwirkungsenergien ($4\text{--}5 \times 10^{-18}$ J), während für das unbeschichtete Glas eine Anziehung ($-1,4 \times 10^{-17}$ J) ermittelt werden kann.

Tab. 11: Berechnungsparameter der freien Grenzflächenenergie

	B33	TL	PEG	Chitosan	Bemerkung
Hamakerkonstante [J]	$8,8 \cdot 10^{-22}$	$1,4 \cdot 10^{-21}$	$1,4 \cdot 10^{-21}$	$1,4 \cdot 10^{-21}$	nach C.J. van Oss
Oberflächenspannung [mN/m]	50,1	41,5	56,7	36,2	Säure-Base-Modell
van der Waals-Anteil	41,6	32,5	48,5	33,9	
Säure-Anteil/ Base-Anteil	59,7 / 0,3	10,7 / 0,11	40,64 / 0,41	34 / 0,04	
Medium Wasser	21,0 / 25,5 / 25,5				nach C.J. van Oss
Flusswasserbakterien	17,0 / 6,7 / 60,2				Mittelwert der 5 Keime
Wechselwirkung ΔG_{AB}	38,07	16,39	30,66	30,33	$\Delta G_{AB} = \Delta G_{AB}^{lo} 2\pi R_b \lambda e^{\frac{I_0-D}{\lambda}}$
Zetapotenzial Substrat [mV]	-114	-56,5	-34,3	-33,7	SurPASS (A. Paar GmbH)
Zetapotenzial Keim [mV]	-25	-25	-25	-25	Zetamaster (Malvern Instr.)
Radius Keim [μm]	1	1	1	1	mikroskopisch erfasst
Debyelänge [nm]	10	10	10	10	$\Rightarrow 0,001 \text{ M NaCl}$
Schichtdicke [nm]	0,2	2,4	7	3,8	aus Ellipsometriemessung

Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht eine mögliche Korrelation der berechneten freien Grenzflächenenergien der Phasengrenze Substrat/ Medium/ Mikroorganismus mit der ermittelten Reduzierung der Bioadhäsion für die angewandten Beispielproben.

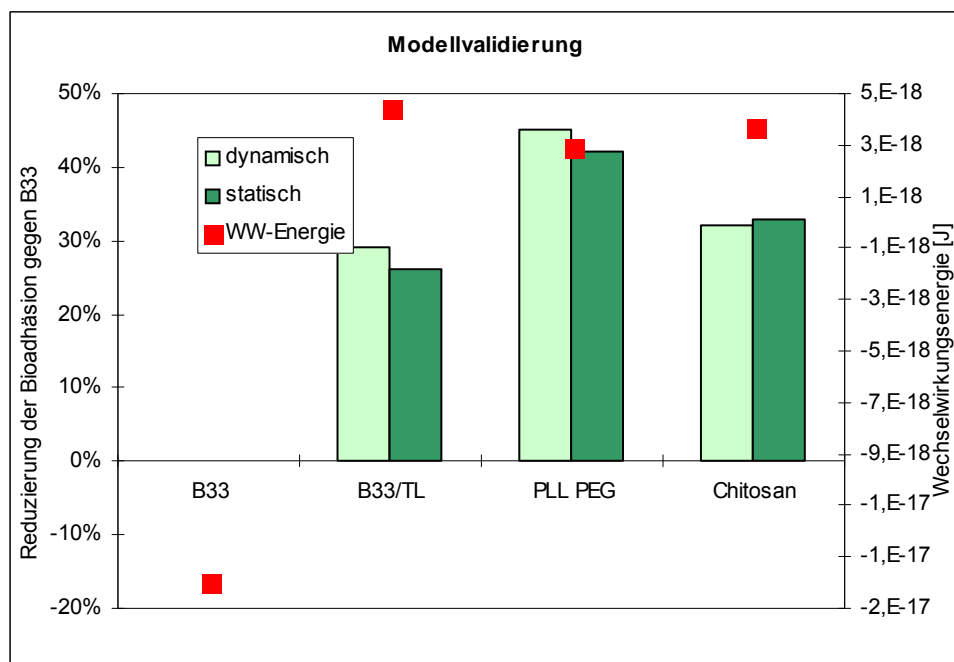


Abb. 68: Darstellung der freien Grenzflächenenergie im Vergleich zur Reduzierung der Bioadhäsion

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Es bleibt festzustellen, dass die Differenzen in der Bioadhäsion zwischen den Lipidmodifikationen sich nicht in der Größe der Grenzflächenenergie widerspiegeln. Die Grundprobleme liegen dabei weiterhin in der exakten Kalkulation der energetischen Oberflächenparameter und dem Aspekt, dass der thermodynamische Ansatz streng genommen für ein geschlossenes System gilt. Zusätzlich wurden die Schichtdicken ellipsometrisch in Luft bestimmt. Auch hier sind Abweichungen bei einer Messung im wässrigen Medium zu erwarten, insbesondere für Polyethylenglykolschichten ist dies aus der Literatur bekannt. Von weiterer Bedeutung für eine exakte Modellvalidierung ist die Bewertung der Mikroorganismen. In die vorliegende Kalkulation fand sowohl für die Bestimmung der Säure-Base-Wechselwirkungsenergie als auch für das Zetapotenzial ein Mittelwert aus den 5 eingesetzten Flusswasserkeimen Eingang.

Dennoch wurde demonstriert, dass die Entwicklung eines Adhäsionsmodells basierend auf der Berücksichtigung thermodynamischer und kolloidchemischer Modellvorstellungen, welches die Beschreibung der initialen bakteriellen Adhäsion erlaubt, für die gezielte Entwicklung von Antifoulingschichten im Gewässermonitoring angewendet werden kann.

6.6 Technologische Umsetzung

Ziele des Arbeitspaketes

Innerhalb des Arbeitsschwerpunktes wird die im Labormaßstab entwickelte Lipidierungsmethodik in einen technisch relevanten Maßstab überführt. Dabei müssen zwei Gesichtspunkte Beachtung finden. Zum einen besteht das Ziel, größere und komplexere Substrate und Komponenten zu beschichten und zum anderen soll eine Methodik der Schichtaufbringung entwickelt werden, die in die Fertigungs- bzw. Produktionsabläufe der Industriepartner 4HJE, IOM und STM integrierbar ist.

In dem beschriebenen Arbeitsschwerpunkt soll zusätzlich geprüft werden, inwieweit die Möglichkeit zur Entwicklung eines in der Praxis einsetzbaren Kontrollsystems der Antifoulingschicht besteht, das zumindest eine Entscheidung hinsichtlich der Weiterverwendbarkeit des Coatings erlaubt.

6.6.1 Scale-up des Beschichtungsprozesses

iba

Im Berichtszeitraum wurden Methoden adaptiert, um aus der bakteriellen Rohmasse von Archaea der Gattung *Sulfolobus* Tetraetherlipide isolieren zu können. Es ist damit erfolgreich gelungen, neben dem ursprünglichen Lipid aus *Thermoplasma acidophilum* eine neue Lipidquelle zu erschließen. Die optimierte Technologie führt direkt zu sauberen Endprodukten. Aus 30 bis 35g Trockenmasse des *Sulfolobus* werden 100 mg Caldarchaeol und 900 mg GDNT gewonnen, welche anschließend in 50 mg aktiviertes Caldarchaeol, 810 mg oxidiertes GDNT und 290 mg geschütztes GDNT modifiziert wird und der Beschichtung zugänglich ist. Da die Ausbeute an GDNT etwa das Neunfache der Masse an gewonnenem Caldarchaeol beträgt, gewinnt aus wirtschaftlichen Gründen eine Umstellung von Caldarchaeol auf GDNT an Bedeutung. Diese Lipide standen dem Konsortium in ausreichender Menge zur Verfügung.

Seitens der Projektpartner bestand der Bedarf, auch große Oberflächen im technologischen Maßstab und entsprechenden Durchsatz mit Tetraetherlipiden zu beschichten. Folglich wurde ein Pilotversuch zum Upscaling der Lipidtechnologie um den Faktor 10 konzipiert und durchgeführt.

Ausgehend von einer Masse lyophilisierter Archaeen von 500 g konnten in diesem Pilotversuch ca. 2,4 Gramm Caldarchaeol und 9 Gramm GDNT aufgereinigt werden. Die Arbeiten von der Hydrolyse bis zur finalen Ausbeute an Tetraetherlipiden wurden in einem Zeitraum von ca. 30 Arbeitstagen durchgeführt. Als Verbrauchsmaterialien kamen in diesem Versuch 7 Liter konzentrierte Salzsäure und ca. 26 Liter Lösungsmittel sowie 1,5 kg Kieselgel für die säulenchromatographische Aufreinigung der gewünschten Lipide zum Einsatz. Der Wechsel vom Labormaßstab zum gleichsam technologischem Maßstab wurde erreicht.

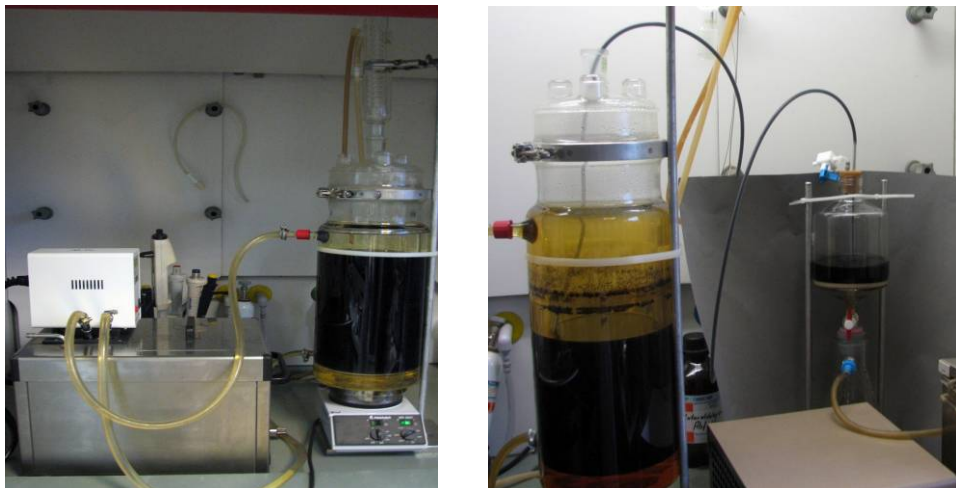


Abb. 69: Up-Scaling Pilotversuch – Aufbau für die Arbeitsschritte Hydrolyse (links) und Extraktion der archaealen Membranlipide im technologischen Maßstab (rechts)

6.6.2 Sensorfunktionsmuster

4HJE

Als erste Komponente von Mess- und Analysentechnik im Bereich des Gewässermonitorings, für die eine Applikation des Antifoulingkonzeptes auf der Basis von spezifisch funktionalisierten Tetraetherlipiden in Frage kommt, wurde die Debubbereinheit von Durchflusssmessstrecken ausgewählt. Hierbei handelt es sich um ein Glasgefäß, das sowohl der Beseitigung von Luftblasen in der Durchflusssmessstrecke als auch der Integration optischer Sensoren dient. Eine Verhinderung des Bewuchses in diesem Gefäß ist erforderlich, um durch ungehinderten Einblick die Funktionsfähigkeit des Systems beurteilen zu können und die Messfähigkeit der optischen Sensoren sicherzustellen. Die bisher angewandte Reinigungsprozedur des Spülens mit verdünnter Säure hat den Nachteil, dass sie nur zyklisch erfolgt und sich damit immer wieder Bewuchs und Verschmutzungen im Glasgefäß festsetzen, die dann beim Spülen auch nicht vollständig entfernt werden, so dass sich im Laufe der Zeit eine immer dicker werdende Schicht aus Mikroorganismen und organischer Verschmutzung absetzt. Weiterhin wird durch Lichteinfall das biologische Wachstum begünstigt. Entsprechende Glaszylinder wurden beschafft und den Partner für die Entwicklung einer Beschichtungstechnologie und die Lipidierung mit einer ausgewählten TL-Modifikation zur Verfügung gestellt.

Die 4H-Durchflusssmessstrecke ist ein autonomes, wartungsarmes Messsystem, das speziell für den dauerhaften Einsatz auf Schiffen, Messplattformen und an Flussmessstellen geeignet ist. Das Messsystem besteht aus einer Wasserstrecke, die über eine externe Pumpe mit Messmedium versorgt wird. In einem internen Kreislauf, der gleichzeitig für eine Entfernung störender Luftblasen sorgt, werden die verschiedensten Sensoren eingebunden. Damit lassen sich wesentliche

Wasserqualitätsparameter wie Wassertemperatur, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration, Salzgehalt, Trübung und Chlorophyll-a-Fluoreszenz zuverlässig aufzeichnen. Der Elektronikteil beinhaltet u.a. einen Industrie-PC zur Steuerung des Systems und Messdatenerfassung und -verwaltung.

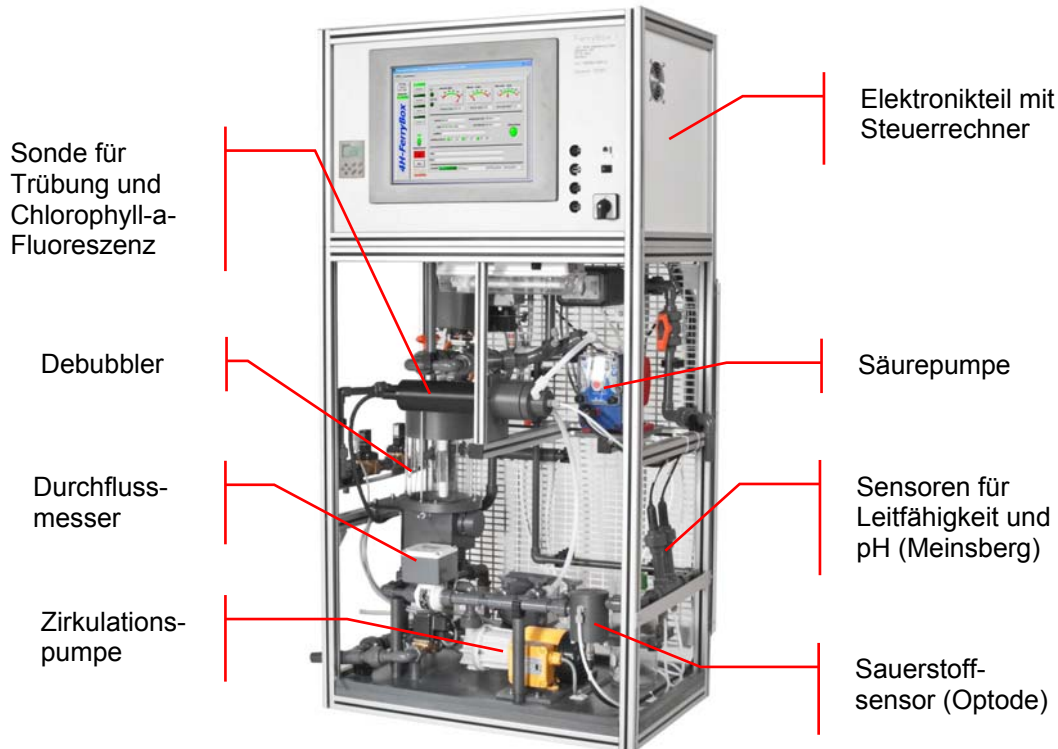


Abb. 70: Beispiel für eine 4H-Durchflussmessstrecke Typ I mit ausgewählter Sensorik

Da die Auswahl eines Schichtsystems für den Demonstrationstest erst nach dem letzten Feldtest erfolgte, konnte eine Erprobung mit einer kompletten Durchflussmessstrecke im Projektzeitraum nicht mehr realisiert werden. Als Alternative wurde ein Debubbler-Teststand aufgebaut, der einen direkten Vergleich eines unbeschichteten und eines Tetraetherlipid-beschichteten Glaszylinders erlaubt. In diesem Versuchsaufbau werden ca. 5 l mit Aufwuchsorganismen versetztes Wasser von der Trinkwassertalsperre Neustadt in einer Zirkulation parallel durch die beiden Debubbler gepumpt. Als Schichtsystem wurde GDNT PO4 verwendet. Die Beschichtung erfolgte aus wässrig alkoholischer Lösung am iba Heiligenstadt.

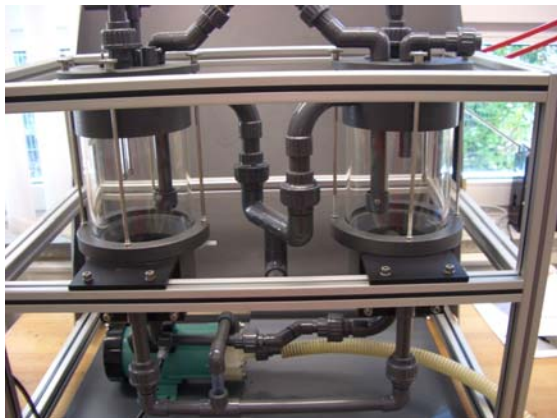


Abb. 71: Konzept Teststand Debubbler-Einheit
Juli 2009



Abb. 72: Debubbler-Teststand fertig für Versuche
November 2009

Die Zirkulationspumpe wurde während des Tests über eine Zeitschaltuhr gesteuert und lief an Arbeitstagen täglich 8 Stunden. Da sich das Wasser durch das Umwälzen nach und nach erwärmt, wurde eine Temperaturmessung integriert. Die Messwerte zeigten, dass sich das Wasser im Betrieb auf 30 bis 34°C erwärmt und über Nacht dann wieder auf 26°C abkühlt. Da die Versuchsbedingungen aber für beide Debubblergefäße identisch waren, wurden die Ergebnisse weder durch die Temperatureffekte noch durch den Stillstand des Systems beeinflusst.

Zu Beginn des Versuchs war festzustellen, dass der mit GDNT PO₄ beschichtete Glaszylinder schlechter benetzbar ist, als der unbeschichtete Zylinder. An der benetzten Innenwandung des Zylinders sammelten sich sehr viele kleine Luftblasen an, was auch zu einer schnelleren Verschmutzung der Oberfläche führte. Nach 2 Wochen im Dauertest traten diese Luftblasen nicht mehr auf.

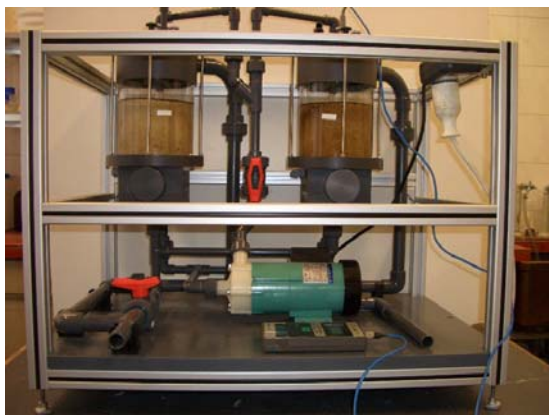


Abb. 73: Teststand im laufenden Versuch



Abb. 74: unbeschichteter (li) und beschichteter (re) Zylinder



Abb. 75: unbeschichteter Zylinder nach 9 Wochen im Test mit Talsperrenwasser



Abb. 76: GDNT PO₄ beschichteter Zylinder nach 9 Wochen im Test mit Talsperrenwasser

Das anfänglich beobachtete schnellere Ansetzen biologischen Materials an der beschichteten Oberfläche setzte sich konstant über den Versuchsablauf fort, der mit 9 Wochen Dauer der Expositionszeit der Proben im Feldtest entsprach. Möglicherweise hätten hydrophilere Tetraetherlipid-Modifikationen, wie z.B. TL PLL PEG 5000 bessere Resultate geliefert. Ein entsprechender Test konnte durch die bei MLU nicht mehr verfügbare Beschichtungstechnologie nicht realisiert werden. Auch die Kombination einer Antifoulingbeschichtung mit einer zyklischen Spülung mit verdünnter Säure konnte im Rahmen dieses Vorhabens nicht mehr untersucht werden.

IOM

Eine weitere Zielsetzung des Vorhabens bestand darin, Methoden zu untersuchen, die ein hochempfindliches Gewässermonitoring durch direkte Messung der uv-induzierten Autofluoreszenz ermöglichen. Teilaufgaben hierbei waren:

- Herstellung/Optimierung hochempfindlicher Fluoreszenzsensoren
- Charakterisierung der spektralen und zeitlichen Signatur der Autofluoreszenz mit dem Ziel der Identifizierung von Wasserinhaltsstoffen
- Erforschung von Methoden zur selektiven Quantifizierung der Wasserinhaltsstoffe

Sensorfunktionsmuster

Zwei verschiedene Typen von Fluoreszenzsensoren wurden entwickelt und untersucht:

1. ein faseroptischer Fluoreszenzsensor bestückt mit 7 Lichtleitfasern,
2. ein abbildender Fluoreszenzsensor, genannt Messkopf.

Der Vorteil dieser Konfiguration liegt darin begründet, dass es sich um einen einfachen mechanischen Aufbau handelt, der leicht zu fertigen ist und stabil und robust in der Handhabung ist. Der mittlere Lichtleiter (siehe Sondenquerschnitt, Abb. 77) dient dem Transport des Anregungslichts zur Probe, die 6 ringförmig angeordneten Lichtleiter erfassen einen Teil der induzierten Fluoreszenz.

Dieser Sondentyp ist geeignet für klare Lösungen bei großer Messtiefe.

Ein Foto des faseroptischen Sensors ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

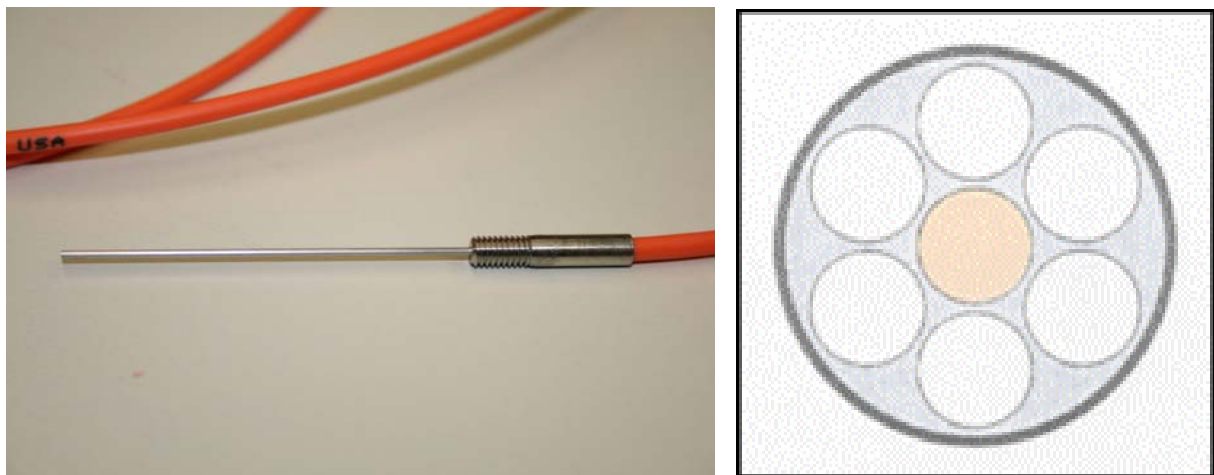


Abb. 77: Faseroptische Sonde vom Typ 003-496 (7x200 μm Fasern, Länge der Sondenspitze: 50 mm, Gesamtlänge: 3,15 m), Sondenquerschnitt

Das optische Konzept des Messkopfs beruht auf der Verwendung dichroitischer Strahlteiler für die kollimierte Auflichtbeleuchtung und zur Trennung von Anregungs- und Emissionsstrahlung sowie auf der Verwendung einer Linse für die Fokussierung des Anregungslichts in die Probe. In der linken Hälfte der folgenden Abbildung ist die Simulation des Strahlenganges durch der Messkopf zu sehen.

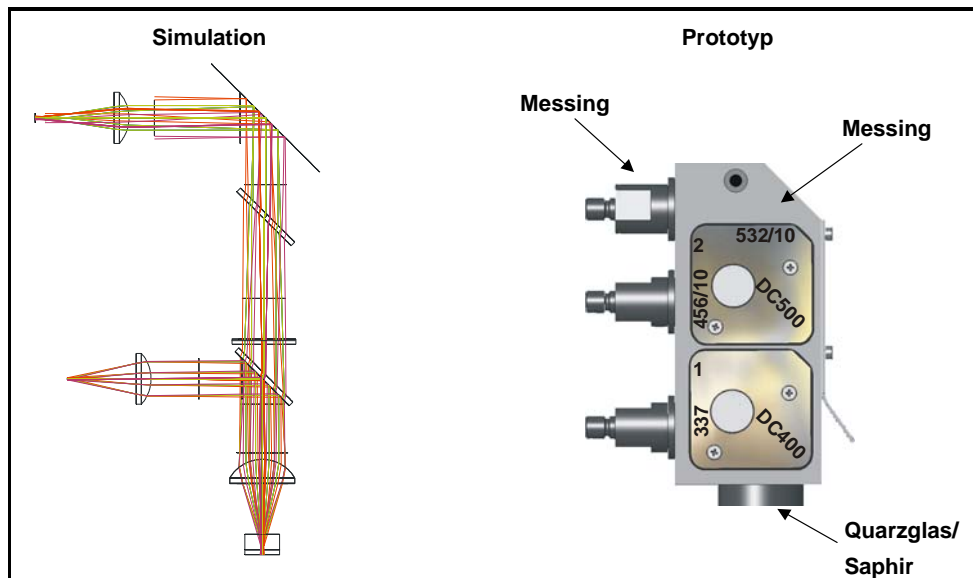


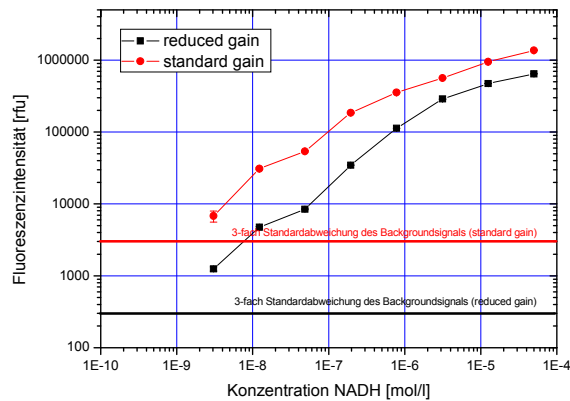
Abb. 78: Optisches Design und Layout eines Messkopf-Prototyps

Vorteilhaft bei dieser Konfiguration sind der größere Arbeitsabstand von Messkopf und Probe, ähnlich wie bei einem Fluoreszenzmikroskop, und die verringerte Schärfentiefe aufgrund der Fokussierung des Anregungslichts. Letzteres führt zu einem niedrigeren Niveau an Störfluoreszenz von außerhalb des „Field of View“-Bereichs und zu kleineren nutzbaren Probenvolumina.

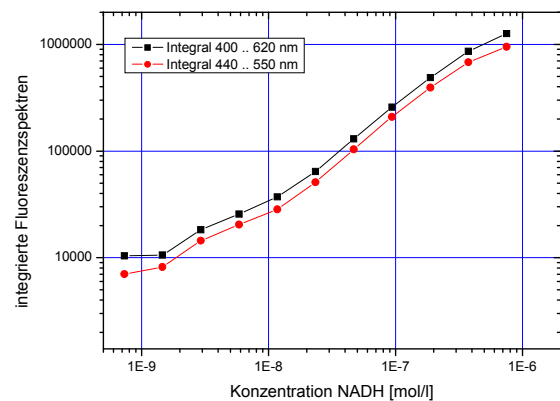
Dieser Sondentyp ist geeignet für Messungen in Proben mit geringerer Messtiefe und für streuende Proben.

Charakterisierung der Empfindlichkeiten beider Sondentypen:

Die Empfindlichkeit der Sonden wurde zunächst anhand einer NADH-Konzentrationsreihe in destilliertem Wasser untersucht. Damit konnte gezeigt werden, dass beide Sondentypen eine fast identische Empfindlichkeit haben. Außerdem wurde gezeigt, dass die GDNT-Beschichtung der faseroptischen Sonden keine Beeinträchtigung der Empfindlichkeit verursacht. Es wurden auch keine Anzeichen einer störenden Eigenfluoreszenz der GDNT-Beschichtung beobachtet.



Typ 1 – Fasersensor, GDNT-beschichteten Sonde (Typ-Nr. 003-496), die Messung erfolgte mit 3 ml Probenvolumen in Küvetten



Typ 2 – Messkopf, die Messung erfolgte in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten mit 350 µl Füllmenge

Abb. 79: Empfindlichkeit der Sensoren (Nachweisgrenze - NWG)

Links: Fasersensor, NWG für NADH von ca. $1 \cdot 10^{-9}$ mol/l (Anregung: 337 nm, Detektion: 460/50 nm)

Rechts: Messkopf, NWG ca. $1,5 \cdot 10^{-9}$ mol/l ermittelt (Anregung: 337 nm, Detektion: 440 ... 550 nm)

Mit dem Messkopf wurde außerdem die Empfindlichkeit der Messung von Fluorescein in NaOH bestimmt. Es wurde wiederum in schwarzen Mikrotiterplatten mit einem Probenvolumen von 350 µl gemessen. Hiermit konnte gezeigt werden, dass beide Sensorvarianten eine vergleichbare und sehr hohe Empfindlichkeit bei der Fluoreszenzmessung aufweisen.

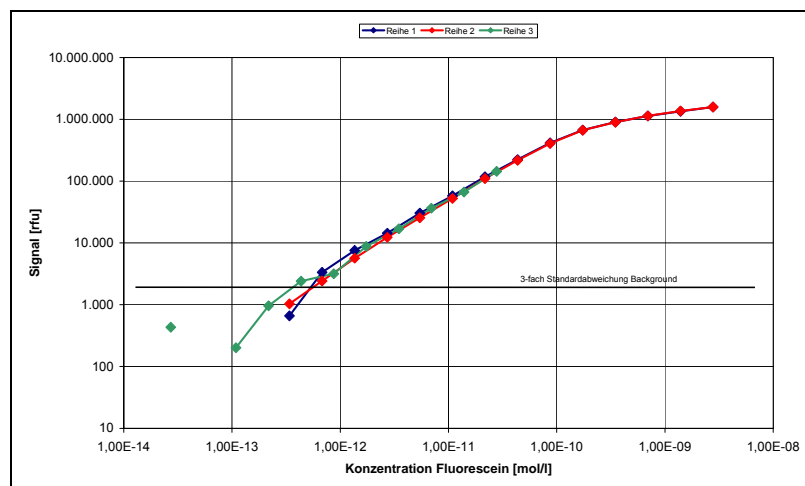


Abb. 80: Fluoreszenzsignal einer 3-fachen Fluorescein-Konzentrationsreihe

Messkopf (Anregung: 488 nm, Detektion 520/10 nm, NWG für Fluorescein ca. $1 \cdot 10^{-12}$ mol/l).

Charakteristik der Autofluoreszenz einer natürlichen Gewässerprobe

Messungen der Autofluoreszenzeigenschaften natürlicher Wasserproben erfolgten mit der Zielstellung, möglichst fluoreszierende Wasserinhaltsstoffe zu identifizieren, und zu untersuchen, in wie weit durch Messung der uv-angeregten Autofluoreszenz eine Bewertung der Belastung des Wassers mit bio-aktiven Mikroorganismen detektiert werden kann. Ein möglicher Indikator hierfür ist der Stoffwechsel der Mikroorganismen, bei dem NAD(P)H eine wichtige Rolle als Energieüberträger spielt. Unter uv-Anregung fluoresziert NAD(P)H im blauen Spektralbereich bei ca. 465 nm.

Durchgeführt wurden zunächst stationäre Messungen der Autofluoreszenz natürlicher Wasserproben. Die Messungen wurden mit dem Fluoromax 4 (Horiba Jobin Yvon, Horiba, Minami-Ku Kyoto, Japan) durchgeführt. Die Messungen wurden mit normalem Wasser aus dem Teltowkanal durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte am 21. Juli 2008. Es wurden Spektren bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen durchgeführt.

Darüber hinaus wurden die Proben zentrifugiert (3000 rpm, 5 min) und es wurden Fluoreszenzspektren des Überstands und des Konzentrats vermessen.

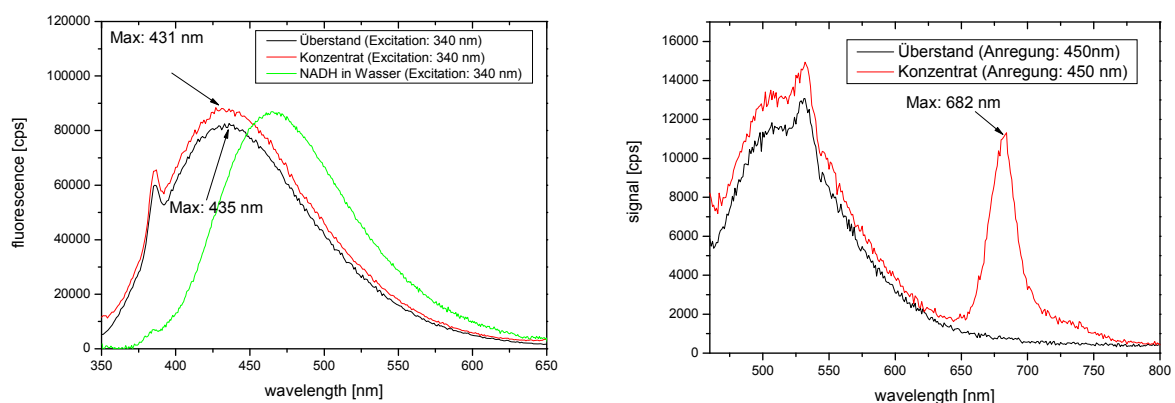


Abb. 81: Fluoreszenzspektren von Kanalwasser bei Anregung mit 340 nm (links) und 450 nm (rechts)

Der Vergleich mit einem NADH-Spektrum (linkes Diagramm, grüne Kurve) zeigt, dass die UV-angeregten Fluoreszenzspektren des Kanalwassers mit ihrem Maximum bei ca. 430 nm deutlich vom NADH-Fluoreszenzspektrum abweichen. Auch das Spektrum der Konzentrat-Probe, in der stoffwechsel-aktive Mikroorganismen angereichert sind, zeigte keine signifikante Änderung der spektralen Charakteristik. Der Anteil Stoffwechsel-bezogener Autofluoreszenz war somit gering.

Die Spektren bei Anregung mit 450 nm zeigten ein Signalmaximum bei ca. 530 nm, wobei das Spektrum des Konzentrats der zentrifugierten Probe zusätzlich einen Chlorophyll-Peak bei 682 nm besaß. Durch das Zentrifugieren wurden somit Photosynthese-betreibende Mikroorganismen im Pellet aufkonzentriert.

Stationäre uv-angeregte Fluoreszenzmessungen sind scheinbar nicht geeignet, Stoffwechsel-bezogene Fluoreszenzsignale aus natürlichen Wasserproben abzuleiten.

Bieten zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen bessere Möglichkeiten für eine selektive Erfassung der Stoffwechsel-bezogenen Autofluoreszenz?

Es wurden zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen realer Wasserproben mit dem Messgerät LF502 NanoScan durchgeführt, das in der Lage ist, ns-aufgelöste Fluoreszenzabklingkurven aufzunehmen.

Die Durchführung war ähnlich wie bei den stationären Messungen. Die Proben wurden abzentrifugiert und zu je 50 µl in eine 384-Well- Mikrotiterplatte gefüllt. Es wurden Proben aus dem Überstand nach dem Zentrifugieren und aus zwei verschiedenen konzentrierten Aufschlämmungen des Pellets vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 337 nm. Die Autofluoreszenz der Proben wurde bei 460/50 nm detektiert.

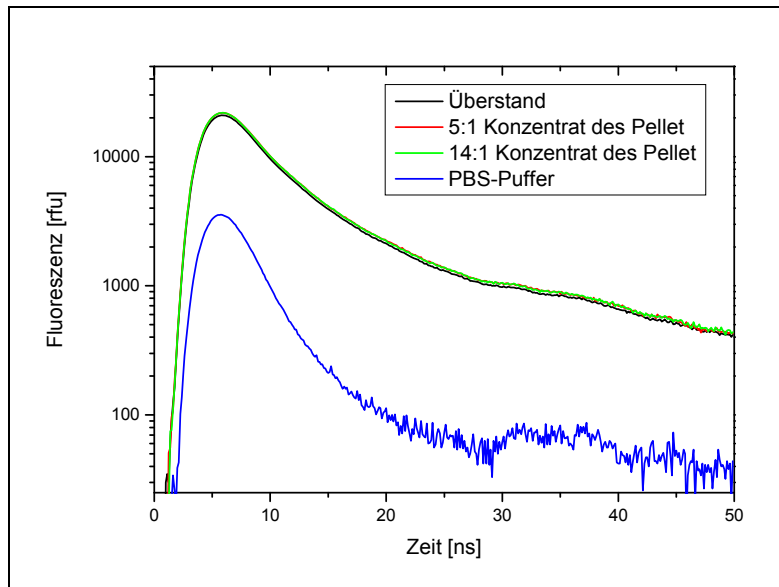


Abb. 82: Zeitaufgelöste Fluoreszenzsignale der Autofluoreszenz einer natürlichen Wasserprobe im Vergleich zum Hintergrundsignal von PBS-Puffer

Die Auswertung der Fluoreszenzabklingkurven erfolgte mit der numerischen Kurvenfit-Funktion des Mikrotiterplattenreaders mit einem bi-exponentiellen Fit. Anschließend wurde aus den beiden Einzelkomponenten die mittlere Fluoreszenzlebensdauer ausgerechnet:

Tab. 12: Fluoreszenzlebensdauer

	mittlere Lebensdauer [ns] ± SD
Überstand	10,08 ± 0,13
Konzentrat 5:1	10,11 ± 0,21
Konzentrat 14:1	10,37 ± 0,03

Es ergaben sich nur geringfügige Unterschiede zwischen den Abklingkurven und den berechneten mittleren Lebensdauern der Proben, die eine unterschiedliche Konzentration an Stoffwechsel-aktiven Mikroorganismen aufweisen sollten.

In einem weiteren Arbeitsschritt wurden zeit- und spektralaufgelöste Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Verwendet wurde das Fluoreszenzspektrometer LF401 Lambda. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 337 nm. Die Fluoreszenzabklingkurven wurden zwischen 410 und 580 nm mit einer Schrittweite von 10 nm gemessen und analysiert.

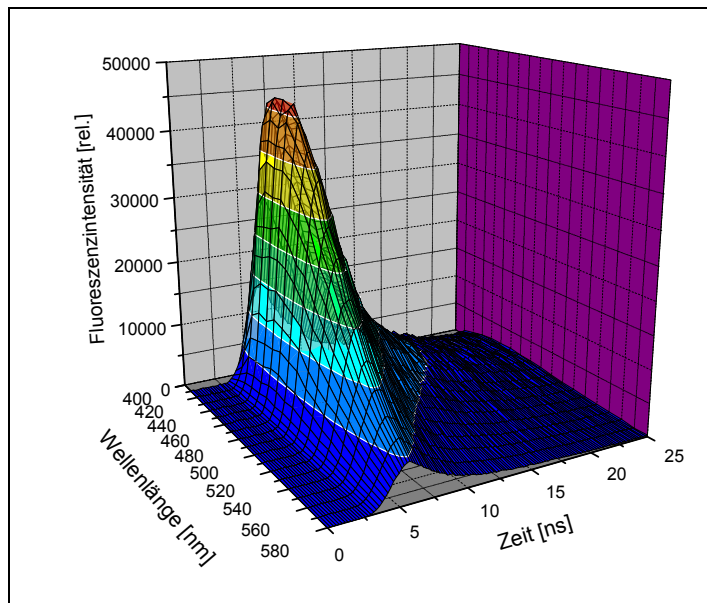


Abb. 83: Dreidimensionale Messung der Autofluoreszenz einer Wasserprobe

Die Analyse der Messung erfolgte mit Hilfe der Methode „Global-Analyse“ mit dem Programm DC4 (Eigenentwicklung der IOM GmbH). Diese Methode erlaubt die Verknüpfung der einzelnen Fluoreszenzabklingkurven mittels eines physikalischen Modells. In diesem Fall wurden bei einer 2-fach-exponentiellen Kurvenanalyse die Fluoreszenzlebensdauern der einzelnen Kurven verlinkt, d.h. es wurde vorausgesetzt, dass alle Kurven durch dieselben Fluorophore „erzeugt“ wurden. Es wurde lediglich zugelassen, dass die „Beiträge“ der einzelnen Fluorophore zum Signal spektral unterschiedlich gewichtet sind.

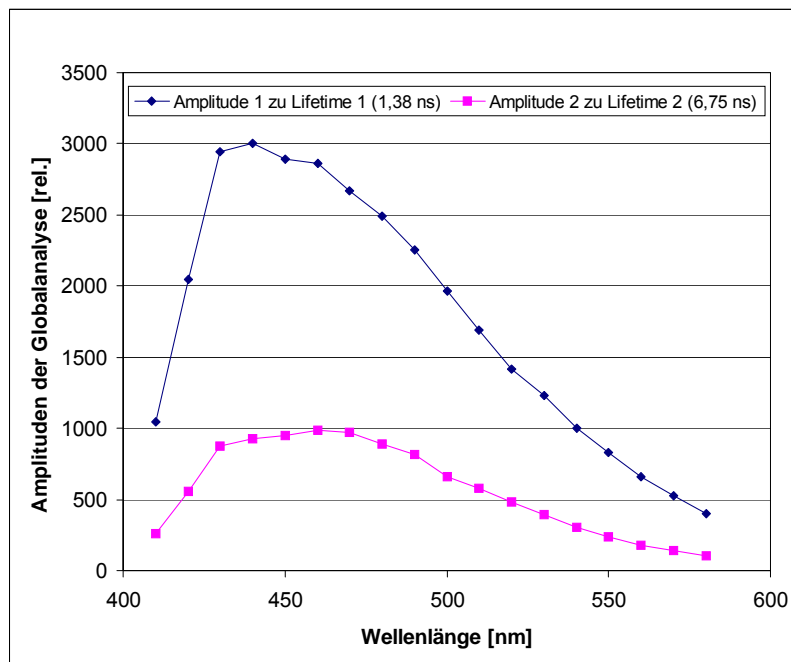


Abb. 84: Spektrale Verteilung der relativen Amplituden der Global-Analyse (decay associated spectra)

Die ermittelten Fluoreszenzlebensdauern dieser Analyse betrugen ca. 1,4 und 6,8 ns. Aus der Spektralverteilung ist zu entnehmen, dass die kürzerer Lebensdauer ihren Schwerpunkt bei ca. 420...430 nm besitzt, während die längerer Lebensdauer einen Schwerpunkt bei 460...470 nm aufweist. Die Lage des Fluoreszenzmaximums und der relativ lange Lebensdauerwert von 6,8 ns für die zweite Komponente weisen auf das Koenzym NADPH hin. Aus Literaturangaben sind Lebensdauerwerte bis 9 ns für NADPH bekannt (Steigenberger S, Terjung F, Grossart H-P, Reuter R: „Blue-Fluorescence of NADph as an Indicator of Marine Primary Production, EARSel eProceedings 3, 1/2004“).

Durch einen Vergleich mit Literaturangaben wurden Hinweise darauf gefunden, dass es sich bei der Komponente mit der kürzeren Lebensdauer von 1,4 ns um die Fluoreszenz von in Wasser gelösten Gelbstoffen handeln könnte. Dazu gehören Fulvosäuren und Huminsäuren. Sie sind die wesentlichen Bestandteile der als Gelbstoffe bezeichneten Abbauprodukte toter organischer Materie.

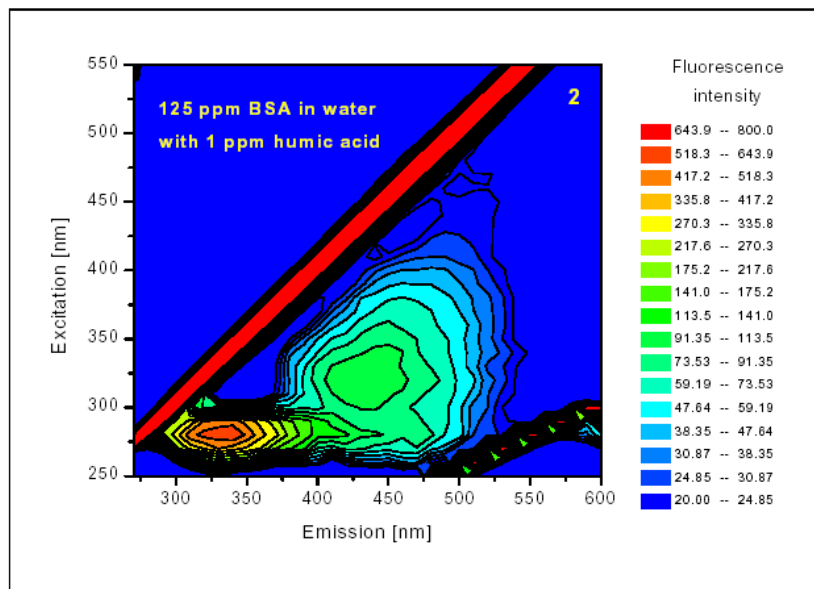


Abb. 85: 3D-Fluoreszenzspektrum von Huminsäure mit BSA (Quelle: Michael Höfer, Dissertation, „Chemischer und mikrobiologischer Nachweis clostridialer Neurotoxine als potentielle biologische Kampfstoffe unter besonderer Berücksichtigung der Huminsäureproblematik“)

Das 3D-Spektrum zeigt eindeutig das Fluoreszenzmaximum der Huminsäure bei ca. 430 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 325 nm. Die Emissionsbande bei 330 nm ist der Fluoreszenz von BSA (Bovine Serum Albumin) zuzuordnen.

Die Analyse der kombinierten spektral- und zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung von natürlichen Wasserproben führt somit zu der Schlussfolgerung, dass bei uv-Anregung mit 337 nm der dominierende Anteil der Fluoreszenz mit einem Maximum bei 430 nm auf im Wasser gelöste Gelbstoffe zurückzuführen ist. NAD(P)H-bezogene und damit einer Stoffwechsel-Aktivität zuzuordnende Fluoreszenz konnte wahrscheinlich mittels Global-Analyse identifiziert werden.

Im Ergebnis dieses Arbeitspakets kann festgehalten werden, dass Antifouling-beschichtete faseroptische Sonden (Fluoreszenzsensor Typ 1) in Verbindung mit spektral- und zeitaufgelösten Messungen eine sensitive und selektive Analyse der Autofluoreszenz natürlicher Wasserproben *in situ* ermöglichen. Der Schlüssel für selektive Analyse liegt in der Kombination aus spektral aufgelöster Messung und der globalen Analyse der Fluoreszenzlebensdauern. Bei Verwendung geeigneter Kontroll-Lösungen könnte sogar eine quantitative Bewertung der Gewässerbelastung mit organischen Abbauprodukten und Mikroorganismen (Algen, Bakterien) möglich sein.

STM

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurden die benötigten Sensorfunktionsmuster für pH- und Leitfähigkeitsmessungen sowie ausgewählte sensitive Komponenten von amperometrischen Sauerstoffsensoren und Referenzelektroden zur späteren Beschichtung und Charakterisierung aufgebaut. Diese Muster (s. beispielsweise Abb. 86) stellten die Grundlage für die Beschichtung (AP 6.3) bzw. deren Charakterisierung (AP 3.1 und AP 3.4) dar. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden regelmäßig in den Optimierungszyklus zur Verbesserung der Tetraetherlipidbeschichtungen (AP 1.4) eingespeist und sind wesentliche Grundlage der Anpassung der Beschichtung an die Sensorfunktionsmuster (AP 6.3).

Für den abschließenden Feldtest wurden weitere pH- und Referenzelektroden sowie Redoxeinstabmessketten und Sauerstoffsensoren aufgebaut, bei MLU mit CPP bzw. CCS beschichtet und bei STM im Labor endgeprüft.



Abb. 86: Sensorfunktionsmuster bzw. deren Komponenten als Basis für spätere Untersuchungen an beschichteten elektrochemischen Sensoren (links: pH-Glaselektrode, Leitfähigkeitsmesszelle, Teil einer Referenzelektrode; rechts: Komponenten eines Sauerstoffsensors)

6.6.3 Anpassung der Beschichtung an die Sensorfunktionsmuster

STM

Zur Anpassung der Beschichtungseigenschaften und des Beschichtungsverfahrens an die unterschiedlichen elektrochemischen Sensortypen wurden bei STM zahlreiche Funktionsmuster aufgebaut (s. AP 6.2). Diese Sensoren bzw. Sensorkomponenten für pH-, Referenz-, Leitfähigkeits- und Sauerstoffmessungen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Funktionalität (AP 3.4) und teilweise auch mittels EIS (AP 3.1) charakterisiert und an die Projektpartner iba bzw. MLU schrittweise zum Beschichten mit GDNT bzw. modifiziertem CL übergeben. Nach Wiederholung der Charakterisierung an den beschichteten Mustern durch STM wurden die erzielten Ergebnisse und Erfahrungen in den Optimierungsalgorithmus eingespeist.

Größerer Optimierungsbedarf bestand vor allem bei Beschichtungen mit GDNT, für die anfänglich vergleichsweise geringe Erfahrungen vorlagen. Insbesondere die Lipidierung von Komponenten für Sauerstoffsensoren und Referenzelektroden bedurfte mehrerer Optimierungszyklen. Bei letzteren besteht sowohl für GDNT als auch für CCS noch Optimierungsbedarf.

6.6.4 Entwicklung eines Wartungs- und Kontrollsystems

IOM

Die Zielsetzung im Rahmen dieses Arbeitspunktes bestand darin, Zuarbeiten zu einem feldtauglichen Wartungs- und Kontrollsystem für die Antifouling-Beschichtung zu leisten. Insbesondere ging es darum, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt, Beschichtungen nach ihrer Herstellung bzw. während des Einsatzes zu detektieren und zu charakterisieren. Im Hinblick auf Untersuchungen zur Bewertung von Homogenität und Dichte von TEL-Schichten und die Ableitung eines Verfahrens zur Qualitätskontrolle wurden Experimente zum Anfärben organischer Doppellipid-Schichten mit einem Fluoreszenzmarker durchgeführt. Beschichtete und unbeschichtete Probestücke wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiO (3,3'-Diocadecyloxacarbocyanine perchlorate, Sigma D4292) angefärbt. Es wurden Versuche mit Edelstahlproben mit den Abmessungen 75 x 25 x 0,5 mm aus dem Material V2A (DIN 1.4301) sowie mit B33-Borofloatgläsern durchgeführt. Von beiden Materialien wurden vom iba Heiligenstadt Proben zur Verfügung gestellt, die mit GDNT beschichtet waren.

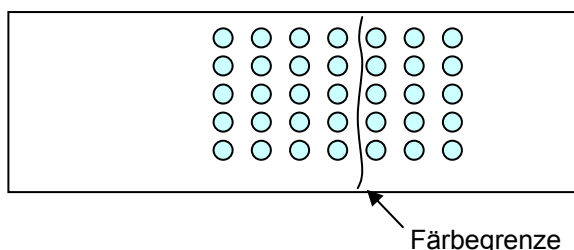
Folgende vier Probeträgertypen wurden für die Messung vorbereitet:

1. 1 B33-Slide, beschichtet mit GDNT
2. 1 B33-Slide, unbeschichtet
3. Edelstahl-Slide V2A, beschichtet mit GDNT
4. Edelstahl-Slide V2A, unbeschichtet

Für die Inkubation der Probestücke wurden folgende Lösungsmittel getestet: Ethanol, DMSO (Dimethylsulfoxid) und wässriger PBS-Puffer.

Das Protokoll der Anfärbung lautete wie folgt: Zunächst wurde eine Stammlösung von DiO in DMSO mit einer Konzentration von 1 bis 2 mM angesetzt. Anschließend wurde die Stammlösung ca. 40 ml des jeweiligen Lösungsmittels aufgelöst. Es folgten die Herstellung einer Arbeitslösung von DiO mit einer Konzentration zwischen 20 und 50 µM, die Reinigung der Probestücke durch Schwenken in Aceton, die Inkubation vertikal stehend in der Färbelösung. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 90 bis 120 Minuten. Dabei ragte ein Teil des Slides aus der Lösung heraus, so dass dieser Teil nicht angefärbt wurde. Dieser Teil diente dann zur Referenzierung. Nach der Inkubation erfolgte das Abspülen der Probestücke mit Ethanol aus der Spritzflasche, um überschüssigen Farbstoff abzuspielen, das Schwenken des Probenträgers in jeweiligen Lösungsmittel im Becherglas und das Trocknen der Probestücke.

Die Messung erfolgte mit dem Reader LF502 NanoScan mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Detektionswellenlänge von 520 nm im Raster über die Färbegrenze hinweg.



Relevant für die Auswertung war nun der Vergleich der Signale des angefärbten Bereichs der Probestücke im Vergleich zum Eigensignal aus dem nicht angefärbten Bereich.

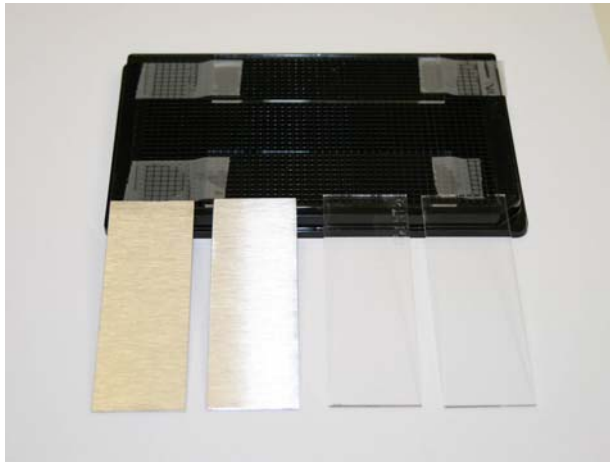


Abb. 87: Edelstahl und B33-Borofloat-Probestücke mit Mikrotiterplatte zur Probenaufnahme

Ein Beispiel für die Auswertung zeigt die folgende Tabelle, die von einem B33-Slide nach DiO-Anfärbung in Ethanol stammt:

Tab. 13: Auswertung der Fluoreszenzmessung

	DiO-gefärbter Bereich	Nicht DiO-gefärbter Bereich
B33-Slide (#53) mit GDNT	19.546 ± 15.559	8.165 ± 4.251
B33-Slide ohne GDNT	9.827 ± 2.800	7.015 ± 4.449

Für den Vergleich der Anfärbung in den verschiedenen Lösungsmitteln wird nun die Zunahme des Fluoreszenzsignals der DiO-gefärbten GDNT-Beschichtung relativ zum unbeschichteten Referenz-Slide ermittelt. Für das Material B33-Glas ergaben sich folgende Signale:

Tab. 14 Fluoreszenzsignal

Lösungsmittel der Färbelösung	Relative Differenz der Zunahme des Fluoreszenzsignals
Ethanol	8.569 rel.E.
DMSO	7.815 rel. E.
PBS	5.561 rel. E.

Es erweist sich somit, dass die Anfärbung der GDNT-Schichten mit dem Farbstoff DiO am besten in einem ethanolischen Lösungsmittel erfolgen sollte. Zur Veranschaulichung wird die Verteilung des Fluoreszenzsignals nach DiO-Anfärbung in Ethanol dargestellt: Man erkennt anhand der vorherigen Abbildung, dass im angefärbten Areal eine zum Teil doch erhebliche Streuung der gemessene Fluoreszenzsignalintensitäten auftrat.

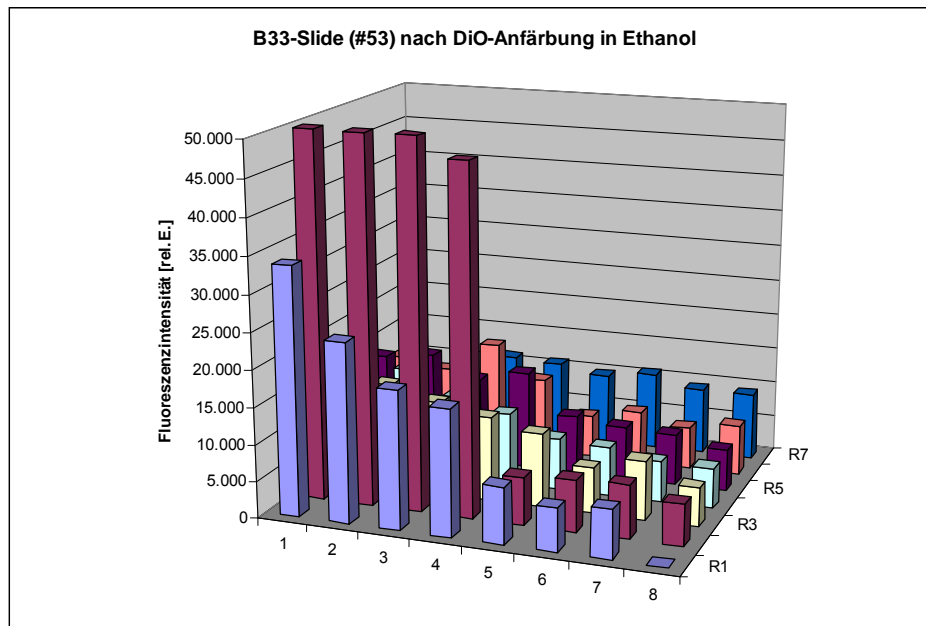


Abb. 88: Signalverteilung auf einem B33-Slide nach Anfärbung mit DiO
(Hierbei liegen die Werte der Spalten 1 bis 4 im DiO-angefärbten Bereich, während die Spalten 5 bis 8 im nicht angefärbten Bereich des Slides liegen.)

Die Messungen mit dem Material V2A gestalteten sich erheblich schwieriger. In der Hauptsache liegt dies in der signifikant anderen Topologie der Probe begründet. Als illustratives Beispiel hierfür dient die folgende fluoreszenzmikroskopische Abbildung der Oberfläche eines V2A-Slides nach der Anfärbung mit DiO.



Abb. 89: Oberfläche einer V2A-Probe nach dem Anfärben, 20x,
Fluoreszenzmikroskop (Anregung: 490 nm, Detektion: 550 nm)

Deutlich zu sehen ist die strukturierte Oberfläche des Materials, die durch feine, nahezu parallele Furchen gekennzeichnet ist. Sie rühren mit großer Wahrscheinlichkeit vom Herstellungsprozess des Ausgangsmaterials her.

Es stellte sich heraus, dass die sorgfältigste Reinigung der Probestücke enorm wichtig ist, weil herstellungsbedingte Öl- und Fettreste auf der Materialoberfläche ein signifikantes Eigensignal liefern. Diese lagern sich insbesondere in den Furchen der Materialoberfläche ab (siehe Abb. 89) und lassen sich sehr gut mit DiO anfärben.

Die Ergebnisse der orts aufgelösten Messung mit dem Reader LF502 NanoScan waren daher in einem viel höheren Maße von Signalschwankungen geprägt, als bei B33-Borofloatglas. Die folgende Tabelle stellt die Signaldifferenz zwischen dem DiO-gefärbten Bereich und dem ungefärbten Bereich der Probestücke dar.

Tab. 15: Zunahme des Fluoreszenzsignals

Lösungsmittel der Färbelösung	Relative Differenz der Zunahme des Fluoreszenzsignals
Ethanol	2.237 rel. E.
DMSO	489 rel. E.
PBS	4.560 rel. E.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass für Edelstahl die Anfärbung in PBS-Pufferlösung geeignet sein könnte. Hier muss aber noch ein Fragezeichen gesetzt werden, weil die Signale sehr stark rauschbehaftet waren. Zumindest sollte aber die Inkubation in einem ethanolischen Lösungsmittel funktionieren.

Zusammenfassend lässt sich ausführen, dass eine Methode abgeleitet werden konnte, mit der die Antifouling-Beschichtung auf (polierten) Glasoberflächen hinsichtlich Homogenität und Dichte bewertet werden kann. Als Messgerät kommt ein handelsüblicher Fluoreszenzreader oder –scanner in Betracht, der mit einem Fluorescein-Filtersatz ausgestattet sein soll. Man könnte auch an speziell entwickelte Hand-gehaltene Fluoreszenzsensoren denken. Das Protokoll der Schichtanfärbung wurde oben dargelegt. Für die untersuchten V2A-Probestücke wäre ein solches Verfahren aber vermutlich nicht geeignet, weil die Oberflächenstruktur viel zu rau ist.

STM

Die Motivation für die Entwicklung eines Wartungs- und Kontrollsystems für Antifouling-Schichten stellt die in der Praxis notwendige sichere Unterscheidung zwischen qualitätsgerechten (intakten) und nicht qualitätsgerechten (defekten) Schichten dar. Ein wesentliches Ziel dieses AP war deshalb die Auswahl- und Überprüfung potentiell geeigneter Indikationsmethoden. Eine derartige, allerdings nur auf elektrisch gut leitfähige Substrate anwendbare Methode, stellt die Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) dar. Im Rahmen des Teilprojektes von STM wurde deshalb untersucht, inwieweit sich mittels EIS sicher und einfach zwischen be- und unbeschichteten leitfähigen Oberflächen unterscheiden lässt (Details s. AP 6.3.1).

Die Untersuchungsergebnisse für pH- und Pt-Leitfähigkeitssensoren zeigten, dass Veränderungen des Impedanzspektrums infolge der Beschichtung feststellbar, aber wenig markant waren. Durch Wahl günstigerer Darstellungsformen für die experimentellen Daten ließ sich die Nachweisbarkeit der Lipidschichten verbessern. Bei pH-Sensoren können die Effekte teilweise durch weitere Einflüsse überlagert werden.

Die Trennung dieser Effekte gestaltete sich als sehr aufwändig und relativ unsicher. Bei Pt-Leitfähigkeitssensoren haben Untersuchungen der zeitlichen Abhängigkeit der gefundenen Effekte gezeigt, dass sich die ohnehin relativ kleinen Unterschiede mit der Einsatzzeit weiter verringern können. Selbst bei verbesserter Darstellungsweise der Ergebnisse dürfte deshalb die EIS insgesamt keine für die Praxis geeignete Methode zur Entwicklung eines Wartungs- und Kontrollsystems für die hier vorliegenden Antifouling-Schichten auf elektrochemischen Sensoren darstellen.

7 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

4HJE

Die Bedeutung von Messtechnik zur dauerhaften online Überwachung von Umweltparametern wird weiter zunehmen, beispielsweise ist im Zuge der Umsetzung der Europäischen Wasserahmenrichtlinie von steigenden Aufwendungen für Wassermesstechnik auszugehen. Ein wesentliches Problem bei Wassermesstechnik (neben der Sensorkalibrierung) sind die Aufwendungen für Wartungen aufgrund von Bewuchs (Biofouling) – denn dieser beeinträchtigt bzw. verhindert korrekte Messungen. Insofern besteht seitens aller Anbieter und Anwender ein erheblicher Bedarf an bewuchshemmenden bzw. bewuchsverhindernden (und dabei nicht umweltschädlichen) Beschichtungen für *in situ*-Messtechnik und deren Träger (von Schiffen und Bauwerken mal ganz abgesehen). Aus diesem Wissen leitete sich die Entwicklungs- und Forschungsnotwendigkeit ab.

Das Marktvolumen für bewuchshemmende Anstriche im Bereich Schiffe und Bauwerke/ Installationen beträgt ca. 1 Mrd. \$ im Jahr (weltweit). Speziell für *in situ*-Wassermesstechnik liegen diesbezüglich keine Zahlen vor. Es wurde daher eine Abschätzung vorgenommen. Das Marktvolumen Messtechnik im Bereich des Gewässermonitorings (inkl. Trägersysteme) beträgt ca. 100 Mio. € p.a. in Deutschland und ca. 500 Mio. € p.a. in der EU. Ein erzielbarer Mehrpreis bei nachweisbarem Zusatznutzen durch bewuchshemmende bzw. bewuchsverhindernde Beschichtung liegt bei ca. 10 bis 20%. Voraussetzung ist natürlich, dass es funktioniert, quasi alle eingesetzten Materialien und Formen müssen beschichtet werden können und die Beschichtung darf die Messungen nicht beeinträchtigen (Transparenz/ Fluoreszenz bei optischen Verfahren). Wie im Kapitel 6.3.4 dargestellt, sind die im Rahmen dieses Vorhabens entwickelten Tetraetherlipid-Modifikationen hinsichtlich ihrer Stabilität und Beeinflussung sensorischer/ funktionaler Eigenschaften gut für die Verwendung im Applikationsfeld *in situ*-Gewässermonitoring einsetzbar. Auch das erzielte Scale up der Beschichtungstechnologie und die Möglichkeit, Schichten aus wässrig alkoholischen Lösungen zu generieren, was einer Applikation des Antifoulingkonzeptes im industriellen Maßstab sehr entgegenkommt bzw. eine solche in manchen Bereichen erst ermöglicht, sprechen für den Einsatz von Tetraetherlipid-Modifikationen. Dem steht gegenwärtig noch eine unzureichende bewuchsverhindernde Wirkung entgegen. Wie im Kapitel 6.4.2 dargestellt, sind die in den Labortestreihen nachweisbaren Antifoulingpotentiale der Tetraetherlipidschichten in den Feldtests nicht so gut zu bestätigen. Eine Ursache hierfür kann die Durchführung der Feldtests als quasi statische Foulingversuche in dem kaum bewegten Wasser der Talsperre und der daraus resultierenden Ablagerung von abgestorbenen Pflanzenmaterial und Sediment auf den Oberflächen der Proben darstellen. Es ist davon auszugehen, dass sich ein Antifoulingkonzept auf Tetraetherlipid-Basis nicht für die gesamte Breite der Applikationen von *in situ*-Wassermesstechnik anwenden lässt. Es ist gut denkbar, dass die bereits erzielte Antifoulingwirkung für Kurzzeitmessungen oder Messungen im strömenden Medium oder kaum sediment-belasteten Meeresgewässern ausreichend ist. Auf jeden Fall zeigen die Ergebnisse, dass der eingeschlagene Weg der sterischen Entkopplung der Oberflächen mittels einer Wasserbarriere prinzipiell Erfolg versprechend aber noch weiter zu optimieren ist.

Die Firma -4H- JENA engineering GmbH plant, über das Vorhaben hinaus weitere personelle und finanzielle Mittel einzusetzen, um die erzielten Ergebnisse in die Realisierung eines Antifoulingkonzeptes auf der Basis von Tetraetherlipid-Modifikationen und damit langfristig in verkaufsfähige Lösungen zu überführen. Dafür beteiligt sich die Firma an einem innovativen regionalen Unternehmensverbund für den Aufbau eines Wachstums-kerns „Bio-Analytik und Oberflächen zur Integration in Systemen“.

					
bmb+f	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

IOM

Die IOM GmbH möchte die Ergebnisse und Erfahrungen des Forschungsvorhabens dazu nutzen, neue Marktsegmente im Bereich Gewässermonitoring und Antifouling-Strategien zu erschließen. Die Basis dafür bildet die langjährige Erfahrung des Unternehmens bei der Detektion der uv-induzierten Autofluoreszenz biologisch aktiver Proben, die bislang erfolgreich insbesondere in der medizinischen Forschung aber auch in der Biotechnologie Anwendung gefunden hat. Mit dem Produkt LF402 Metabolic steht ein hochempfindliches und Prozess-taugliches Online-Fluorimeter zur Verfügung. Von besonderer Bedeutung ist außerdem das Know-how bei der Entwicklung Applikations-spezifischer faseroptischer Sonden bzw. Sensoren.

Durch eine geeignete Antifouling-Beschichtung der faseroptischen Sonden besteht daher die Möglichkeit, die attraktiven Eigenschaften des Produkts LF402 Metabolic wie außerordentlich hohe Empfindlichkeit, selektive Erfassung Bioaktivitäts-bezogener Fluoreszenz und Robustheit mit herausragenden Sondereigenschaften wie einer langen Standzeit und hohen Flexibilität zu verbinden. Die Ergebnisse der Sensorentwicklung und -charakterisierung haben gezeigt, dass eine sensitive Erfassung eines Biofilms möglich ist. Hier werden weitere Anstrengungen unternommen, um das Verfahren in Richtung eines Online-Biofilm-Monitorings weiter zu entwickeln. Damit besteht die Möglichkeit, im industriell sehr bedeutsamen Bereich der Entwicklung von Antifouling-Strategien ein objektives und sehr sensitives Verfahren anbieten zu können und Marktanteile zu erlangen.

Eine weitere Möglichkeit der Nutzung der Ergebnisse des Verbundvorhabens besteht darin, dass die Tetraetherlipid-Technologie eine Basis für das definierte Beschichten optisch aktiver Flächen darstellt, die so mit gezielten Eigenschaften versehen werden können (Polarität, Hydrophobizität). Diese Erfahrungen und Technologien, die bei den Verbundpartnern etabliert sind, können in zukünftige Entwicklungen von analytischen Messinstrumenten einfließen, die derzeit noch nicht absehbar sind.

STM

In der Oberflächen- und Grundwasserüberwachung, der Abwasseraufbereitung und insgesamt im Umweltmonitoring sind eine Vielzahl charakteristischer chemischer und physikalischer Parameter zu erfassen und teilweise zur Steuerung und Regelung von Prozessen zurückzuführen. Dem Vorteil der zeitnahen Erfassung dieser Parameter durch Online-Messtechnik stehen als Nachteil die mit dem Dauereinsatz in Wasser verbundenen Ablagerungen biologischer Substanzen auf den Sensoren gegenüber, die bis hin zur Biokorrosion führen können und einen wesentlichen Einflussfaktor auf deren Zuverlässigkeit und Verfügbarkeit darstellen. Der beim bisherigen Stand der Technik notwendige Wartungsaufwand für Reinigung und Kalibrierung von elektrochemischen Sensoren ist für die Betreiber von Kläranlagen und Wassergüte-Messstationen ein entscheidender Kostenbeitrag, der die Investitionskosten teilweise erheblich übersteigt, qualifiziertes Personal erfordert und in vielen Fällen zum vorzeitigen Ausfall der Sensoren führt. Erklärtes Ziel der Sensortechnik Meinsberg GmbH war es deshalb im Rahmen dieses Verbundprojektes eine in der Praxis wirksame Antifoulingbeschichtung für eine Anzahl unterschiedlicher elektrochemischer Sensoren in Kooperation mit den Verbundpartnern zu entwickeln. Diese Beschichtung sollte auf optimierten Tetraetherlipiden basieren. Außerdem sollte die Immobilisierung dieser Lipide auf den Sensoroberflächen technologisch entwickelt werden.

Nach Abschluss des Projektes liegen zahlreiche Versionen modifizierter Tetraetherlipide sowie Verfahren zu ihrer Abscheidung auf den Oberflächen unterschiedlicher Materialien vor. Für mehrere davon konnte gezeigt werden, dass ihr Aufbringen die wesentlichen Messeigenschaften der hier untersuchten elektrochemischen Sensoren nicht oder nur unwesentlich beeinflussen. Allerdings hat sich auch gezeigt, dass eine deutliche Verbesserung der bewuchshemmenden Eigenschaften der

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Tetraetherlipide gegenüber dem Ausgangsstand dieses Projektes offensichtlich wesentlich schwieriger ist als erwartet. Außerdem ließen sich die unter Laborbedingungen (iba) nachgewiesenen Antifoulingeffekte bisher noch nicht im erforderlichen Maße in Feldtests reproduzieren – verschiedene Tests laufen allerdings zurzeit noch oder werden ab Frühjahr 2010 reaktiviert bzw. neu aufgebaut. Den noch ausstehenden Beweis einer unter Praxisbedingungen ausreichend hohen Wirkung der Antifoulingsschicht vorausgesetzt, ist weiterhin der folgende ursprünglich angestrebte Nutzen zu erwarten:

- Verlängerung der Wartungszyklen und damit Reduzierung von Personalkosten für den Betrieb der Analysen-Messtechnik in Kläranlagen und Wassergüte-Messstationen
- Erhöhung der Zuverlässigkeit und damit der Aussagefähigkeit von Analysen-Messtechnik bei der Steuerung von Wasseraufbereitungsanlagen
- Option der Nachrüstung vorhandener Anlagen mit TL-beschichteten Sensoren aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung der Kenndaten dieser Sensoren mit denen konventioneller Ausführungen
- Möglichkeit zur erfolgreichen Kombination der Antifoulingbeschichtung mit konventionellen Reinigungsverfahren
- Verbesserung der Einsatzmöglichkeiten von Online-Analyse-Messtechnik in der Wasser- und Abwasseraufbereitung gegenüber der Laboranalytik

Darüber hinaus besteht prinzipiell die Möglichkeit das vorliegende Antifoulingkonzept auf weitere Sensoren/ Sensorkomponenten bzw. Teile von Armaturen, die längerzeitig mit wässrigen Medien in Kontakt stehen, anzuwenden. Der tatsächliche Umfang der Verwertbarkeit der Projektergebnisse bei STM wird allerdings letztendlich sowohl von den Resultaten der laufenden bzw. noch vorgesehenen Feld- und Praxistests als auch von den mit der Beschichtung verbundenen Kosten abhängen.

CAM-D

Nach Ende des Projektes besitzt die CAM-D die Technologien und das Wissen, um komplexe chemische Prozesse auf Materialoberflächen zu berechnen. Die Anwendung von MFD-Simulationstechniken zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Lipiden und technischen Festkörperoberflächen besitzt großes Innovationspotential, und aufgrund der in dem Projekt entwickelten Methoden und Verfahren können nun Fragestellungen aus dem Bereich Materialwissenschaften mit Computersimulationsmethoden von der CAM-D bearbeitet werden. Somit profitieren auch zukünftige Kunden von den Entwicklungen. Durch den erweiterten Kundenkreis für Auftragsforschungsarbeiten erhofft sich die CAM-D eine Umsatzsteigerung und eine damit verbundene Expansion.

iba

Die entwickelten Technologien sollen genutzt werden, um bereits existierende und am Markt etablierte Sensorsysteme wirkungsvoll zu modifizieren und zu verbessern. Allerdings wird bei der Produktentwicklung und Markteinführung auf margenstabile Spezialprodukte der jeweiligen Industriepartner orientiert. Für das iba Heiligenstadt als außeruniversitäre Forschungseinrichtung ergeben sich die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten speziell durch die Erweiterung des Dienstleistungsangebotes auf dem Gebiet des Biofilmmonitorings und der *in vitro*-Testung.

Die Möglichkeit der reproduzierbaren Bestimmung von Adhäsionskinetiken biologischer Systeme auf technischen Oberflächen unter verschiedenen praxisrelevanten Randbedingungen sollte darüber hinaus auch für Normungs- und Standardisierungsgremien von außerordentlicher Bedeutung sein.

Es wird die potenzielle Nutzung der neu entwickelten Schichtsysteme als Hydrogelbasierte Antifoulingstrategie für die Bioanalytik im Rahmen eines regionalen Wachstumskerns angestrebt.

– Abschlussbericht –		Seite 88 von 95
----------------------	---	-----------------

					
bmb+f	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

MLU

Eine direkte Verwertung der Projektergebnisse nach Abschluss des Vorhabens an der MLU erfolgt aufgrund der Auflösung der Arbeitsgruppe Dr. Rothe nicht. Das gesamte Know How wird anhand von Protokollen für jeden Schichttyp zum iba nach Heiligenstadt transferiert und dort auch weiter verwertet.

8 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt bei anderen Stellen

4HJE

Im Rahmen des von der EU finanzierten Projektes AMBIO sollen „intelligente“ Oberflächen ohne Biozide entwickelt werden, die umweltfreundlich gegen Biofouling wirken und vorrangig zum Schutz technischer Oberflächen im marinen Bereich eingesetzt werden sollen. Die aus dem Bereich der Nanotechnik stammende Antifouling-Beschichtung basiert auf Kohlenstoffnanoröhren (CNTs). Sie reduzieren das Benetzungsvermögen des klebrigen Biopolymers deutlich und verringern dessen Haftstärke durch die verkleinerte benetzte Fläche so weit, dass normale Strömungskräfte zum Ablösen des Bewuchses genügen. Es wurde nun auch nachgewiesen, dass die in eine Silikonpolymermatrix eingebundenen CNTs nicht ins Wasser freigesetzt werden (s. auch www.ambio.bham.ac.uk).

Quelle: Nanotechnologie – Moleküle · Materialien · Mikrosysteme in „Photonik – Fachzeitschrift für die Optischen Technologien“, No. 6, Dezember 2007.

Diese Antifoulingbeschichtung ist allerdings nicht auf die im Rahmen des Projektes bearbeitete Problematik des Schutzes sensorischer und funktionaler Flächen übertragbar.

Seit dem weltweiten Verbot von Tributylzinn (TBT) im Jahr 2008 hat die Suche nach umweltfreundlichen Antifouling-Substanzen einen Höhepunkt erreicht. Eine der Substanzen, die derzeit getestet werden, ist Metedomidin, ein in der Veterinärmedizin verwendetes Sedativum, von dem auch nachgewiesen wurde, dass es die Adhäsion von Seepockenlarven an Schiffsrümpfen verhindert. Metedomidin wird aktuell nach der EU Biozidprodukte-Richtlinie als aktive Komponente in Antifouling-Farben untersucht. Erste Untersuchungen an Fischen zeigten, dass die Substanz Auswirkungen auf die Pigmentierung von Fischen hat. Fische mit Kontakt zu Metedomidin sind heller. Während die Blässe selbst harmlos ist, ist eine funktionierende Pigmentierung sehr wichtig für die Tarnung, Kommunikation und den UV-Schutz von Fischen. Außerdem wurde eine Beeinflussung von Leberenzymen nachgewiesen. Ein Einsatz als Antifouling-Substanz erscheint damit fraglich („Potential antifouling substance can cause paler fish“, Science Centric, 09.05.2010, www.sciencecentric.com).

Speziell auf dem Gebiet des Gewässermonitoring werden komplexere Mess- und Analysesysteme insbesondere im küstennahen und marinen Bereich durch eine elektrochemische *in situ* Erzeugung von Chlor bzw. hypochloriger Säure in zyklischen Abständen vor Bewuchs geschützt. Dies stellt allerdings eine nicht unerhebliche Beeinflussung des Messmediums dar und ist nicht auf alle Sensoren und/ oder Systeme übertragbar.

Unverkennbar ist in letzter Zeit das Bemühen der Hersteller von Analysen-Messtechnik zur Verlängerung der Wartungszyklen, zur Reduzierung des Wartungsaufwandes und zur Darstellung von Informationen über den Sensorzustand (Sensordiagnose). Zahlreiche Hersteller orientieren sich hier

					
bmb+f	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

an der Verbesserung konventioneller Reinigungsverfahren, der Definition von Wartungsanforderungen durch quasi online Auswertung von Sensorparametern bzw. der redundanten Doppelmessung und Differenzauswertung. Antifoulingmaßnahmen durch Beschichtung von Komponenten sind bisher nahezu unbekannt, da von einer unzulässig hohen Beeinflussung der Sensorkenndaten ausgegangen wird.

IOM

Es gibt eine Reihe von Verfahren zum Biofilm-Monitoring, die auf elektrochemischen, Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen beruhen. Letzteres basiert auf der Anwendung von Fluoreszenzmarkern. Ein Verfahren, basierend auf der direkten Ausnutzung der intrinsischen Fluoreszenzeigenschaften des Biofilms, ist nicht bekannt geworden.

Faser-optische Sonden mit einer Antifouling-Beschichtung von anderen Herstellern oder Instituten sind ebenfalls derzeit nicht bekannt. Auch entsprechende wissenschaftlich/ technische Anstrengungen von dritter Seite sind nicht bekannt geworden.

STM

Während der gesamten Projektlaufzeit sind an anderer Stelle keine wesentlichen Fortschritte bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant waren. Die Informationsrecherchen in Fachzeitschriften und auf Fachtagungen haben gezeigt, dass der Entwicklung von Überzügen, die ein unkontrolliertes Biowachstum auf Materialoberflächen verhindern bzw. reduzieren, in verschiedenen Branchen besonderes Augenmerk geschenkt wurde [z.B. Schulz: KEM 09/2007; Surf. Eng. 25 (2009), 2 pp. 89-91]. Die Schwerpunkte stellten dabei Medizintechnik, „Hygienic Prozessing“, Korrosionsschutz, Wärmeaustauscher, Trinkwasserleitungen und Maschinenteile sowie maritime Anwendungen dar. So wurden beispielsweise diverse Materialien mit antibakteriellen Eigenschaften für medizinische Geräte [Mat. World 16 (2008), 5 p. 11 und 8 p. 24; Mat. in Medicine 19 (2008) p. 3555] und Implantate [Mat. Corrosion 6/2008; Mat. in Medicine 19 (2008) z.B. pp. 27, 1609, 3561; dto. 20 (2009) pp. 281, 733], nano- und plasmatechnologische Oberflächenmodifikationen für „Hygienic Prozessing“ [cav 12/2008; KEM 12/2008, J. Mat. World 17 (2009) 6, p. 3], filmbildende Amine [wwt 9/2008] und die Benetzbarkeit verändernde biomimetische Oberflächenstrukturen [Surf. & Coatings Technol. 203 (2008) p. 137] zur Korrosionverringerung und fluorkohlenstoffgebundener Graphit [cav 3/2008], kohlenstoffbasierte Beschichtungen [CITplus 9/2009] bzw. PFA [CITplus 11&12/2009] für Wärmeaustauscher sowie die so genannte „Haifischhaut“ als Antifouling-Beschichtung von Booten [Handelsblatt 10.09.2008; Bootswirtschaft 4/2008] entwickelt bzw. untersucht. Weiterhin wurden für mechanisch beanspruchte Teile bessere Antihafteigenschaften durch PFA-Beschichtungen [ADELHELM LubriCoat: cav 7/2007] bzw. durch besonders glatte Oberflächengestaltung [SEW-Eurodrive: cav-special 2007] erzielt sowie biofilmmhemmende Emailsichten für Trinkwasserleitungen [Eisenwerke DÜKER: cav 5/2007] bzw. antibakterielle Lackierungen für Getriebemotoren [DANFOSS BAUER: cav 2/2007] und andere Anwendungen [Surf. & Coating Techn. (2009) 203 p. 2841] auf der Basis von Materialien entwickelt, die gezielt Silberionen freisetzen.

Alle hier genannten Fortschritte auf dem Gebiet der Antifouling-Beschichtungen wurden allerdings für andere Anwendungsgebiete entwickelt und sind nicht auf die in diesem Projekt angestrebte, spezielle Zielstellung übertragbar.

iba

Dem Antifouling widmen sich nach wie vor eine Vielzahl von Arbeitsgruppen auf biotechnologischen, umwelttechnischen aber auch medizinischem Gebiet mit den unterschiedlichsten Ansätzen. Grundsätzlich lassen sich die Konzepte vergleichen und auf analoge Parameter zurückführen. Es ergibt sich folgende Einteilung [Frant, M. 2008]:

- die Modifizierung sterischer und physikochemischer Eigenschaften,
- die Gestaltung biomimetischer Oberflächen,
- die Integration toxischer Agenzien mit abgegrenzten Freisetzungskinetiken,
- die Kopplung spezifischer Funktionsmoleküle.

Während der Projektlaufzeit publizierten u.a. Simoes *et al.* [Biofouling 2008] eine Antifoulingstrategie basierend auf der anionischen Oberflächenfunktionalisierung mittels SDS, welche auf Biofilmen in fließender Umgebung partiell sehr effektiv wirkte. Lichter *et al.* [Langmuir 2009] beschrieben ebenfalls eine neue anionisch aktive und antibakterielle Beschichtung mit Hilfe eines Polyelektrolyt-Multischichtsystems. Einen alternativen Ansatz über die photodynamische und auf Staphylokokken antibiotische Wirkung von Toluidin-Blau präsentierten im gleichen Jahr Sharma *et al.* [Antimicrob Agents Chemother 2008]. Mehrere Arbeitsgruppen unterstrichen die antiadhäsive Wirkung dünner Schichten basierend auf der Kopplung und Konformation sterisch wirksamer Polymere unter Aufbau einer abweisenden Wasserbarriere. Fundaneau *et al.* [Coll. Surf. B, 2008] analysierten dahingehend Polyacrylamid-Brushes, während sich Zhou *et al.* [J. Coll. Int. Sci, 2007] auf die Bindung von Polyethylenglykol an ein Chitosanrückgrat konzentrierten.

Dennoch bleibt festzustellen, dass die genannten Antifoulingkonzepte hochspezialisiert sind und auf die hier relevanten, sensorspezifischen Einsatzbedingungen z.B. Strömung, Abrasion nicht übertragbar sind. Darüber hinaus handelt es sich oft um grundlegende Arbeiten, deren praktisches Anwendungspotenzial in Bezug auf das natürliche Habitat noch evaluiert werden muss.

Die vorliegende aktuelle Patentrecherche wurde bezüglich zweier wesentlicher Schwerpunkte durchgeführt: die Darstellung und Funktionalisierung von Tetraetherlipidschichten mit wässriger Chemie sowie die Applikation von Hydrogelen als Antifoulingbeschichtung gekoppelt über das Lipid als membranaloger Spacer. Zu den Deskriptoren zählten bspw.: „tetraetherlipid or archaeobacter“, „lipid or Liposome“, thermophil, thermoacidophil, sulfobolus, GDNT or GDCT, Langmuir Blodgett sowie „antifouling pollutant“, biofoul or coat. Das Rechercheergebnis führte zu 22 relevanten Treffern auf dem Gebiet Lipide und ca. 150 Treffern im Bereich Antifoulingsschichten.

Eine erste Auswertung gelangt zu der Empfehlung, die neu entwickelten Antifoulingsschichten basierend auf wässriger Lipidchemie für eine Patentierung vorzusehen.

MLU

Antimikrobielle Oberflächen und Beschichtungen stellen ungebrochen einen starken Wachstumsmarkt dar. Die Bandbreite reicht von der Beschichtung von Kühlschrankinnenflächen mit antimikrobiellen Materialien über die Ausrüstung medizinischer Oberflächen bis zur Entwicklung neuartiger Lacke und Anstriche in der Baustoffindustrie.

Verschiedenste Strategien, von der Aufprägung spezifischer Oberflächentexturen über die chemische Oberflächenmodifizierung und die oberflächennahe Incorporation von Nanopartikeln (Nano-Silber, Titandioxid, Aluminiumoxid) bis zum Einbringen biozider Wirkstoffe in Oberflächenfilme und Anstriche werden propagiert, um diesen erwünschten Antifouling-Effekt zu erhalten. Die Zahl der publizierten Arbeiten steigt unentwegt, aber ein endgültiger Durchbruch im Sinne einer vollständigen Unterdrückung der Besiedelung mit Mikroorganismen konnte bisher nicht erreicht werden.

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Im Sinne einer Abschlussbetrachtung zu unserem Projekt wäre in Erfahrung zu bringen, wo aktuelle Projekte **die von uns** verfolgten Forschungsansätze weiterentwickeln.

Die Wichtigkeit und Richtigkeit unserer Strategie wird noch hervorgehoben durch das seit 2008 von der EU geförderte Verbundprojekt AMBIO „Advanced nanostructured Surfaces for the Control of Biofouling“ (von J.Callow University of Birmingham gemanagt).

Unser Ansatz fokussierte in 2 Richtungen:

A) Oberflächenvergütung und Beschichtungstechnologien

Eine wichtige Gruppe die auf diesem Gebiet weiterarbeitet sitzt im Freiburger Materialforschungszentrum (Prof. Tiller)

- C.J. Waschinski, R. Hutzler, J. Zimmermann, U. Salz, G. Sadowski, J.C. Tiller **Design of Contact-Active Antimicrobial Acrylate-Based Materials Using Biocidal Macromonomers.** Advanced Materials 20, 104-108 (2008)
- J.C. Tiller **Coatings for Prevention or Deactivation of Biological Contamination.** in: Developments in Surface Contamination and Cleaning. Eds. Rajiv Kohli and K.L. Mittal, William Andrew, Norwich, NY, USA, pp. 1013-1065 (2008)
- J.C. Tiller, C. Waschinski, A. Fuchs, A. Bieser **Design and Mechanisms of Antimicrobial Surfaces.** Macromolecular Rapid Communications 29 (4), F37-F38 (2008)

Hier wird vor allem unser Ansatz einer Oberflächenbeschichtung aus wässriger Lösung (Emulsion) weiterentwickelt.







Auch die Gruppe um Prof. Carsten Werner vom Leibniz-Zentrum Dresden arbeitet aktuell an der chemischen Modifizierung von Polymeroberflächen im Sinne eines Antifouling (Subtilisin-Coating).

Die von uns etablierte Antifoulingausrüstung durch **nachträgliche Peggylierung** der lipidbeschichteten Oberflächen wird aktuell von mehreren Gruppen weiter bearbeitet, allerdings ohne unsere „Tetraetherlipidgrundierung“. (z.B.Yan-Lei Su, Wei Cheng, Chao Li and Zhongyi Jiang-Preparation of antifouling ultrafiltration membranes with poly(ethylene glycol)-graft-polyacrylonitrile copolymers *Journal of Membrane Science, Volume 329, Issues 1-2, 5 March 2009, Pages 246-252*) Die meisten „Peggylierer“ treten außerdem nicht mit dem Anspruch an, die wasserstrukturierende und sterisch entkoppelnde Wirkung der hydrophilen Polymerbrushes herauszuarbeiten.

Bayer hat kürzlich eine antimikrobiell wirksame Polycarbonatoberfläche auf den Markt gebracht (Makrofol). Dabei wird eine anorganische mit Silber dotierte Schicht aufgebracht, die das unerwünschte Ag-Leaching reduziert und eine antiadhäsive Oberflächentextur generiert.

B) Tetraetherlipid-basierte Forschung

Seitdem die hallesche Gruppe (Rothe/ Dölling) nicht mehr existiert, gibt es in Europa niemand mehr, der in größerer Menge Tetraetherlipide isoliert. Allerdings wurde die Technologie nach Heiligenstadt übertragen, so dass hier das Know-How weiterexistiert. Die zweite Firma, die sich mit der TEL-Gewinnung und Modifizierung beschäftigte (Bernina Biosystems München) ist 2008 insolvent gegangen.

					
bmb+f	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

Der Schwerpunkt der Forschung legt sich mehr und mehr auf die chemische Synthese tetraetherlipid-analoger Bolaamphiphile mit ähnlichen Eigenschaften. Eine Motivation ist dabei die Hoffnung, chemisch einfachere und kostengünstige Syntheseverfahren zu finden.

Hierzu arbeiten vor allem die französische Gruppe von Benvegna/ Lemiegre von der Uni Rennes und die hallische Gruppe um Blume/ Dobner. In Rennes existiert seit kurzem ein universitäres spin-off Unternehmen, von dem die neuen Bolaamphiphile vermarktet werden sollen. An einem kommerziellen Einsatz von Tetraetherlipiden besteht vor allem im medizinisch- pharmazeutischem Bereich Interesse (z.B. liposomale Arzneimittelverkapselung für orale Applikation und Gene-delivery). Hier arbeiten aktuell die Gruppen um U. Bakowsky (Marburg) und Fricker (Heidelberg).

Die aktuellste Arbeit über Tetraetherlipide ist gerade erst erschienen.

Chong P. *Archaeobacterial bipolar tetraether lipids: Physico-chemical and membrane properties*. Chem Phys Lipids. (2010) **163** 253-65. Die Autoren versuchen Erklärungen für die extreme Stabilität der supramolekularen Tetraetherlipid-Assemblierungen zu geben.

In diesem Zusammenhang ist auch unser noch nicht erschienenenes aber von Colloid and Surfaces akzeptiertes Paper zu nennen: S. Vidawati, J. Sitterberg, U. Bakowsky, U. Rothe AFM and Ellipsometric Studies on LB films of Natural Asymmetric and Symmetric Bolaamphiphilic Archaeobacterial Tetraether Lipids on Silicon Wafers". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (in press).

Hier wird ebenfalls die Bildung, Stabilität und Textur der supportfixierten Tetraetherlipid-filme untersucht.

CAM-D

Uns sind keine Fortschritte zu dem Themengebiet bekannt geworden.

9 Realisierte und geplante Veröffentlichungen

4HJE

"Biomimetic antifouling coatings for sensor surfaces for water monitoring: Performance control in defined biofilm cultures and under real environmental conditions"

M. Frant, K. Bley, K. Dölling, G. Schaule, H.C. Flemming, U. Rothe, M. Koch, K. Liefelth

Vortrag zur International Conference BIOFILM II, Leipzig, 2006

"Aquacontrol - New automatic multiparameter device for environmental tasks with special aspects to antifouling and data availability"

T. Boehme, K. Bley

Vortrag zum Workshop AquaLife 2010, Kiel, 31. Mai bis 2. Juni 2010

IOM

Messestand:

Analytica 2010, 22. Internationale Messe für instrumentelle Analytik, Labortechnik und Biotechnologie, München, 23.-26. März 2010

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

STM

Realisierte Veröffentlichungen:

- Vortragstagung des Arbeitskreises Elektrochemische Analysenmethoden der Fachgruppe Analytische Chemie (ELACH 7), Waldheim/ Sachsen, 17.-20.09.2006: „Elektrochemische Sensoren mit foulingresistenten Oberflächen – ein biomimetisches Konzept für die Wasseranalytik“ (Vortrag und Publikation im Tagungsband S. 41-44 durch STM und MLU: H. Jahn, R. Lange (†) und U. Rothe, K. Dölling).

Außerdem wurden Erfahrungen beim Einsatz elektrochemischer Sensoren in der Wasser- und Abwasseraufbereitung auf den folgenden Ausstellungen und Tagungen präsentiert:

- Terratec 2007, Internationale Fachmesse für Umwelttechnik und Umweltdienstleistungen, Leipzig (Messestand).
- Sensor & Test 2007, Internationale Messe für Sensorik, Mess- und Prüftechnik mit begleitenden Kongressen Nürnberg (Messestand).
- CIA 2007, 4. Conference über Ionenanalyse, Berlin (Firmenstand).
- IFAT 2008, Internationale Fachmesse für Wasser – Abwasser – Abfall – Recycling, München (Messestand).
- Sensor & Test 2008, Internationale Messe für Sensorik, Mess- und Prüftechnik mit begleitenden Kongressen, Nürnberg (Messestand).
- ACHEMA 2009, Internationaler Ausstellungskongress für Chemische Technik, Umweltschutz und Biotechnologie, Frankfurt a.M. (Messestand).
- Terratec 2009, Internationale Fachmesse für Umwelttechnik und Umweltdienstleistungen, Leipzig (Messestand).
- DWA-Tagung 2009, Fachaussstellung zur Bundes- und Landestagung der Deutschen Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall, Augsburg (Firmenstand).

Geplante Veröffentlichungen:

Eine Publikation von Untersuchungsergebnissen zur Impedanzspektroskopie an mit Tetraetherlipiden beschichteten Metalloberflächen (gemeinsam mit Projektpartner iba) ist vorgesehen.

iba

„Anti-infektive Beschichtungen von polymeren Katheteroberflächen für die peritoneale Dialyse“

M. Frant, K. Dölling, H. Johnsen, P. Stenstad, U. Rothe, R. Schmid, K. Liefeth

Vortrag zur Polymerwerkstoff-Tagung 27.-29.09.06, Halle/Saale

“Biomimetic antifouling coatings for sensor surfaces for water monitoring: Performance control in defined biofilm cultures and under real environmental conditions”

M Frant, K. Bley, K. Dölling, G. Schaule, H.C. Flemming, U. Rothe, M. Koch, K. Liefeth

Vortrag zur International Conference BIOFILM II, Leipzig, 2006

„Anti-adhäsive Beschichtungen auf Tetraetherlipidbasis“

Frant, M, Liefeth; K, Dölling, K, Rothe, U, Johnson, H, Schmid, R

Vortrag zur 8. Wörlitzer Workshop Funktionelle Schichten, 13.06.2007, Wörlitz

“Advantages and Applications of Archae Tetraether Lipids”

S. Grohmann, M. Frant, K. Dölling, U. Rothe, K. Liefeth

Poster zur ECIS 2007, Genf, 10.-14.09.2007

– Abschlussbericht –		Seite 94 von 95
----------------------	---	-----------------

					
	Antifoulingkonzepte für Sensoren für das Wassermonitoring durch sterisch optimierte Tetraetherlipid-Coatings				PTKA-WTE

„Biomimetic coatings of Tetraether Lipids“

S. Grohmann, M. Frant, K. Dölling, U. Rothe, K. Liefelth

Poster zur IFAT 2008, München, 05.-09.05.2008

„Charakterisierung lipidierter Metalloberflächen mittels Impedanzspektroskopie“

G. Hildebrand, E. Hüger, K. Liefelth

Poster zur 14. Heiligenstädter Kolloquium, Heiligenstadt, 22.-24.09.2008

MLU

Poster und Vortrag in Brasilien: **9. Meeting on nanotechnology**, Liposomes and Health in Itaparica Brazil vom 17. -20. 4. 2009

Poster: Tetraetherlipid-Derivatives as biomimetic tool in Pharmacy and Bio(Nano)medical engineering
U.Bakowsky, K.Dölling, E Dayyoub, U.Rothe

Vortrag: Archaeobacterial lipids as biomimetic surface coating. U.Rothe ELECH mit Meinsberg

CAM-D

Die Veröffentlichung der Ergebnisse erfolgt in Absprache mit dem iba im Rahmen von wissenschaftlichen Publikationen. Weiterhin sind keine Veröffentlichungen geplant.

10 Danksagung

Für die Unterstützung bei der Realisierung dieses Verbundvorhabens bedankt sich das Projektkonsortium bei folgenden Institutionen:

- Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF
- Karlsruher Institut für Technologie, Projektträger Karlsruhe Wassertechnologie und Entsorgung, PTKA-WTE, Außenstelle Dresden
- Thüringer Fernwasserversorgung - Anstalt des öffentlichen Rechts.